

ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE LE MICROBIOTE DU LAIT CRU ET  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DANS LE CONTEXTE DE LA MAMMITE BOVINE

par

Melina Cyrenne

mémoire présenté à la Faculté des Sciences en vue de l'obtention du grade maître ès sciences  
(M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 9 août 2019

Le 9 août 2019

*le jury a accepté le mémoire de Madame Mélina Cyrenne dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur François MALOUIN

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeure Carole BEAULIEU

Évaluatrice interne

Département de biologie

Professeur Viktor STEIMLE

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeur Sébastien RODRIGUE

Président-rapporteur

Département de biologie

## SOMMAIRE

La mammite bovine est une maladie à prévalence élevée chez les vaches laitières qui occasionne plusieurs problématiques au niveau de l'industrie agroalimentaire dont des pertes financières importantes. *Staphylococcus aureus* fait partie des bactéries pathogènes majeures causant la mammite bovine et ces infections intramammaires (IIM) ont la particularité d'être difficiles à traiter en plus de souvent mener à une forme chronique de la maladie. En effet, *S. aureus* a la capacité de produire du biofilm ainsi que plusieurs facteurs de virulence qui aident à son évasion du système immunitaire et son internalisation dans les cellules de l'hôte.

Maintenant que l'équipement de séquençage génétique est plus performant et moins coûteux, il est possible d'analyser le microbiote du lait de vache. Un déséquilibre des communautés bactériennes, aussi appelé dysbiose, peut avoir des effets négatifs sur la santé du pis. À l'inverse, un microbiote « en santé » pourrait empêcher l'établissement d'un microorganisme pathogène. Plusieurs études ont démontré que *S. aureus* pourrait faire partie de la flore normale du lait cru puisque cette bactérie est retrouvée dans les échantillons provenant de pis ne démontrant aucun symptôme de mammite.

Ce projet a pour but d'approfondir nos connaissances au sujet des communautés bactériennes du lait cru et comment elles sont influencées par la présence de *S. aureus*. Au cours de ce projet, nous avons eu recours à des techniques de séquençage à haut débit de l'ADN de l'ARN 16S pour explorer la diversité bactérienne du lait de vache cru provenant d'échantillons à haute et à basse prévalence de *S. aureus*. Au niveau du microbiote, nous avons trouvé deux genres

bactériens qui étaient significativement influencés par l'abondance de *S. aureus*, soit *Aerococcus* et *Corynebacterium*. De plus, nous avons exploré comment différentes souches de *S. aureus* affectent le microbiote, sans toutefois obtenir suffisamment de séquences pour pouvoir établir des hypothèses claires. Finalement, pour mieux comprendre les interactions de *S. aureus* avec les bactéries présentes dans le lait, nous avons eu recours au séquençage de l'ARN pour étudier la transcriptomique de *S. aureus* en culture dans différents laits, ce qui nous a permis de démontrer des différences significatives dans l'expression de certains gènes liés à la virulence.

Mots clés : mammite bovine, microbiote, *Staphylococcus aureus*, transcriptomique, séquençage

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier sincèrement le Pr. François Malouin, Ph.D., d'avoir accepté avec beaucoup d'ouverture d'esprit ma proposition de sujet de maîtrise, en plus de m'avoir permis d'entreprendre plusieurs autres petits projets qui m'ont construit en tant que scientifique. Merci d'avoir toujours cru en moi malgré les aléas de ma vie.

Je remercie ensuite nos collaborateurs, M. Denis Roy, Ph.D., M. Simon Dufour, Ph.D., et M. Martin Chénier, Ph.D., qui m'ont grandement aidé et enseigné au fil de ce projet. Je remercie aussi le regroupement Op+Lait qui a financé ce projet en plus de me donner la chance de participer à de nombreux ateliers et congrès. J'aimerais aussi remercier mes conseillers, M. Sébastien Rodrigue, Ph.D., et Mme Carole Beaulieu, Ph.D., pour leurs nombreuses recommandations.

Pour leur patience et leur expertise, je remercie aussi M. Jean-François Lucier (B.Sc.) et Kevin Neil (M.Sc.). Pour leurs nombreux conseils et les discussions stimulantes, je remercie aussi les membres du laboratoire, plus particulièrement Mme Céline Ster, Ph.D., et M. Eric Brouillette (M.Sc.).

Finalement, je remercie chaleureusement mes ami-e-s et les membres de ma famille qui m'ont soutenu aux travers de ces années de bouleversements, plus particulièrement ma mère qui m'a toujours encouragé à dépasser mes craintes et mes limites.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
LISTE DES TABLEAUX .....	12
LISTE DES FIGURES .....	14
CHAPITRE 1 .....	16
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	16
1.1 La mammites bovine .....	17
1.1.1 Problématiques.....	18
1.1.1.1 L’industrie laitière .....	18
1.1.1.2 Pathologie.....	19
1.1.2 La mammites bovine causée par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
1.1.2.1 Épidémiologie.....	21
1.1.2.2 Les mammites cliniques et sous-cliniques .....	23
1.1.2.3 Pathogénèse .....	25
1.1.2.4 Les facteurs de persistance .....	29
1.1.2.5 Les interactions polymicrobiennes impliquant <i>S. aureus</i> .....	31
1.1.2.5.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	32
1.1.2.5.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
1.1.2.5.3 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	37
1.1.2.5.4 Bactéries lactiques.....	39
1.1.2.5.5 <i>Corynebacterium</i> sp. ....	42
1.1.2.6 Prévention .....	44
1.1.2.6.1 Mesures d’hygiène .....	44
1.1.2.6.2 Antibiothérapies .....	46
1.1.2.6.3 Vaccination .....	48
1.2 Le microbiote du lait de vache cru .....	50
1.2.1 La voie entéromammaire.....	50

1.2.2 Les communautés bactériennes retrouvées dans le lait de vaches considérées comme saines .....	52
1.2.3 Les modificateurs du microbiote du lait cru .....	55
1.2.3.1 La diète.....	55
1.2.3.2 Environnement et mesures d'hygiène.....	61
1.2.3.3 La mammite.....	65
1.2.3.4 Les antibiothérapies .....	68
1.2.3.5 La vaccination .....	70
1.2.4 Méthodes d'étude et d'analyse du microbiote du lait .....	72
1.3 Projet de maîtrise .....	75
CHAPITRE 2 .....	77
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	77
2.1 Analyse et comparaison du microbiote du lait cru chez des vaches naturellement infectées à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	77
2.1.1 Échantillonnage.....	77
2.1.2 Extraction de l'ADN du lait cru.....	79
2.1.3 qPCR avec les amorces sélectionnant la région V1-V2 de l'ADN de l'ARN 16S .....	80
2.1.4 Séquençage et analyse des données .....	82
2.2 Modifications du transcriptome chez <i>Staphylococcus aureus</i> Newbould en croissance dans différents laits.....	83
2.2.1 Protocole de coculture .....	83
2.2.2 Extraction de l'ARN .....	85
2.2.3 Séquençage et analyse de données.....	86
2.3 Effets de différentes souches de <i>Staphylococcus aureus</i> sur le microbiote d'un lait considéré comme sain.....	87
2.3.1 Protocole de coculture .....	87
2.3.2 Traitement au propidium monoazide .....	88
2.3.3 Extraction de l'ADN du lait cru.....	89
2.3.4 qPCR avec les amorces sélectionnant la région V1-V2 de l'ADN de l'ARN 16S .....	90
2.3.5 Séquençage et analyse des données .....	91

CHAPITRE 3 .....	92
RÉSULTATS .....	92
3.1 Analyse et comparaison du microbiote du lait cru chez des vaches naturellement infectées à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	92
3.1.1 Description de l'échantillon.....	92
3.1.2 Concentration d'ADN obtenu.....	94
3.1.3 Résultats des qPCR .....	95
3.1.4 Généralités du séquençage.....	97
3.1.5 Diversité et richesse des échantillons.....	98
3.1.6 Analyse des prévalences bactériennes.....	100
3.2 Modifications du transcriptome chez <i>Staphylococcus aureus</i> Newbould en croissance dans différents laits.....	105
3.2.1 Courbes de croissance .....	105
3.2.2 Concentration et qualité de l'ARN extrait.....	106
3.2.3 Généralités du séquençage.....	109
3.2.4 Modifications au niveau du transcriptome de <i>S. aureus</i> Newbould .....	111
3.2.5 Différences au niveau du transcriptome : comparaison lait-bouillon TS.....	112
3.2.6 Différences au niveau du transcriptome : comparaison lait SA + vs lait SA – .	120
3.2.7 Modifications d'expression des gènes liés au processus infectieux .....	128
3.3 Effets de différentes souches de <i>Staphylococcus aureus</i> sur le microbiote d'un lait considéré comme sain.....	134
3.3.1 Sélection des souches de <i>S. aureus</i> .....	134
3.3.2 Courbes de croissance .....	136
3.3.3 Concentration d'ADN obtenu.....	137
3.3.4 Résultats des qPCR .....	139
3.3.5 Généralités du séquençage.....	141
3.3.6 Diversité et richesse des échantillons.....	142
3.3.7 Analyse des prévalences bactériennes.....	144
CHAPITRE 4.....	147
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE .....	147
BIBLIOGRAPHIE .....	165





## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Nom complet	Abréviation utilisée
<i>Staphylococcus aureus</i> Newbould	SANB
Unité formatrice de colonie	UFC
Bouillon tryptone soja	TSB
Gélose mannitol-sel	MSA
Unité taxonomique opérationnelle	OTU
Infection intramammaire	IIM
Neutrophiles polymorphonucléaires	PMN
<i>Small-colony variant</i>	SCV
Acidose ruminale chronique	ARC
Bactérie à acide lactique	BAL
Compte des cellules somatiques	CCS
Prévalence de SA + supérieure à 5 %	SA +
Prévalence de SA + inférieure à 5 %	SA -
Propidium monoazide	PMA
Immobilisation reversible en phase solide	SPRI

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	CCS des vaches sélectionnées pour l'étude.....	93
Tableau 2.	Concentration de l'ADN obtenu après l'extraction avec la trousse PowerFood de Qiagen.....	94
Tableau 3.	Concentration d'ADN obtenue après le premier et le deuxième cycle d'amplification et de purification par SPRI.....	96
Tableau 4.	Les 5 genres dont la prévalence est significativement différente chez le lait SA + en comparaison avec le lait SA –.....	102
Tableau 5.	Les espèces bactériennes des 5 genres dont la prévalence est significativement différente dans le lait SA + en comparaison avec le lait SA –.....	103
Tableau 6.	Concentration d'ARN obtenue à partir de l'insert contenant la culture de <i>S. aureus</i> Newbould en contact avec le lait des différentes vaches en fonction de la prévalence de <i>S. aureus</i> (SA + : 5 à 95 %; SA - : < 2 %).....	107
Tableau 7.	Nombre de séquences obtenues suite au séquençage de l'ARN extrait de <i>S. aureus</i> Newbould en croissance en contact avec le lait des différentes vaches en fonction de la prévalence de <i>S. aureus</i> (SA + : 5 à 95 %; SA - : < 2 %).....	110
Tableau 8.	Liste des gènes exprimés de façon significativement différente par SANB en croissance dans les laits SA + en comparaison avec son expression dans les laits SA – indifféremment de la provenance (vache).....	121
Tableau 9.	Liste des gènes exprimés de façon significativement différente par SANB en croissance dans les laits SA + en comparaison avec son expression dans les laits SA – analysé selon la vache. ....	123
Tableau 10.	Liste des gènes liés au processus infectieux exprimés par SANB en croissance dans les laits et le bouillon TSB .....	130

Tableau 11.	Liste des souches de <i>S. aureus</i> sélectionnées pour l'inoculation du lait sain.....	135
Tableau 12.	Concentration d'ADN des aliquots de lait SA – de la vache 2 après inoculation avec les souches de <i>S. aureus</i> , et suite au traitement PMA et l'extraction d'ADN avec la trousse PowerFood de Qiagen.....	138
Tableau 13.	Concentration d'ADN des aliquots des laits SA – inoculés de la vache 2 obtenu après le premier et le deuxième cycle d'amplification au qPCR et de purification par SPRI.....	140

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Distribution des 20 genres bactériens les plus abondants dans 50 échantillons de lait cru provenant de vaches saines avec un compte de cellules somatiques inférieur à 20 000 cellules/ml (Oikonomou et al., 2014).....	53
Figure 2.	Pourcentage des distributions d'OTU dans le lait contrôle (A) et le lait de vaches nourries avec un supplément d' <i>A. nodosum</i> (B) (Lopez et al., 2016).....	59
Figure 3.	Graphique de dissimilarité représentant les 5 groupes classés en fonction du CCS (Oikonomou et al., 2014).....	67
Figure 4.	Index de diversité de Shannon et index de richesse de Chao1 calculés avec le pipeline QIIME2 selon la prévalence de <i>S. aureus</i> dans les échantillons.....	98
Figure 5.	Graphique de dissimilarité de Bray-Curtis calculé avec QIIME2.....	99
Figure 6.	Prévalence (%) des phylums retrouvés dans les échantillons triés selon la prévalence de <i>S. aureus</i> (SA +: 5 à 95 %; SA -: < 2 %).....	100
Figure 7.	Prévalence (%) des 20 genres les plus abondants dans les échantillons SA + et SA -.....	101
Figure 8.	« Heatmap » de tous les genres retrouvés ainsi que des espèces de <i>Staphylococcus</i> sp., colorés en fonction de leur prévalence (barre de droite en %). ....	104
Figure 9.	Log <sub>10</sub> du nombre d'UFC de <i>S. aureus</i> Newbould comptés sur gélose mannitol-sel en fonction du temps de culture dans le lait de toutes les vaches .....	105
Figure 10.	Changement au niveau de l'expression des gènes des différentes voies métaboliques.....	112
Figure 11.	Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie des traitements des informations environnementales.....	114

Figure 12.	Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie des traitements des informations génétiques.....	115
Figure 13.	Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie du métabolisme général.....	117
Figure 14.	Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie des processus cellulaires.....	119
Figure 15.	Log <sub>10</sub> des UFC/ml de souches de <i>S. aureus</i> déterminé par décompte sur gélose mannitol-sel à certaines heures lors de la coculture dans le lait SA – de la vache 2, trié selon leur type <i>spa</i> .....	136
Figure 16.	Indices de Shannon et de Chao1 calculés avec QIIME2 en fonction du type <i>spa</i> des souches inoculées.....	142
Figure 17.	Graphique de dissimilarité de Bray-Curtis calculé avec QIIME2 en fonction du type <i>spa</i> des souches inoculées.....	143
Figure 18.	Prévalence des espèces/genres retrouvés dans les laits témoins (sans inoculation avec <i>S. aureus</i> ) après 6 heures de croissance.....	144
Figure 19.	Graphique montrant la prévalence de tous les espèces/genres obtenus chez les contrôles et chez le lait infecté par les souches des types <i>spa</i> .....	146

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

La mammite bovine, une inflammation de la glande mammaire principalement causée par la présence d'une bactérie pathogène, est un problème récurrent pour les producteurs laitiers. Elle a pour symptômes une baisse de la production laitière en plus de changements dans l'apparence du lait, et mène à une hausse du compte de cellules somatiques (CCS). Ce CCS est limité par un seuil de 400 000 cellules/ml pour la vente de lait au Canada. C'est une maladie coûteuse, régulièrement causée par *S. aureus*, qui a la particularité de causer des infections chroniques. Les antibiothérapies ont un taux de réussite hautement variable et il n'existe toujours pas, à ce jour, de vaccin commercial efficace contre cette bactérie chez les vaches laitières. Il devient donc important de se tourner vers d'autres armes potentielles, comme le microbiote. Le microbiote du lait cru contient une diversité bactérienne importante qui peut avoir un effet protecteur contre l'invasion de *S. aureus*. Par exemple, il pourrait être intéressant de comprendre pourquoi *S. aureus* se retrouve dans le microbiote du lait chez certaines vaches saines, tout en créant des infections intramammaires (IIM) chez d'autres. Le but de ce projet était donc de mieux comprendre la relation entre le microbiote du lait cru et *S. aureus*, en gardant en perspective une potentielle utilisation d'espèces bactériennes du lait comme probiotique pour guérir et/ou prévenir les IIM causées par cette bactérie.

## **1.1 La mammite bovine**

La mammite bovine est une inflammation de la glande mammaire chez le bovin laitier qui peut être causée par une blessure, mais elle est plus souvent d'origine infectieuse. Les IIM ont une forte prévalence dans l'industrie laitière, où les conséquences sont multiples. Cette maladie se caractérise par divers symptômes, dont l'inflammation du pis, une apparence modifiée du lait ainsi que des symptômes systémiques comme de la fièvre.



### **1.1.1 Problématiques**

#### **1.1.1.1 L'industrie laitière**

La mammite bovine a des conséquences importantes pour l'industrie laitière, la première étant le rejet du lait ayant une trop forte teneur en cellules somatiques (Zhang *et al.*, 2015). Au niveau de la ferme, la mammite amène dans un premier temps une diminution de la quantité et de la qualité du lait (Schukken *et al.*, 2009). Les baisses de production laitière ont été étudiées de façon extensive, et il est estimé qu'une vache souffrant d'une mammite produit en moyenne 15 % moins de lait (Schukken *et al.*, 2009). Il a aussi été découvert que cet effet s'accroît à chaque mammite subséquente (Jamali *et al.*, 2018). Avec les antibiothérapies, les agriculteurs doivent rejeter le lait impropre à la consommation, ce qui ajoute aux pertes financières (Bar *et al.*, 2008). De plus, les taux de reproduction sont aussi réduits (Hertl *et al.*, 2010), en plus de changements comportementaux liés à la douleur que ressent l'animal (Medrano-Galarza *et al.*, 2012). Certaines mammites bactériennes, comme celles causées par *S. aureus*, prennent parfois une forme chronique ce qui peut entraîner à la réforme hâtive de l'animal. Finalement, le taux de survie des vaches diminue après une mammite, et chute s'il s'agit d'une mammite récurrente (Cha *et al.*, 2013). Le coût total de cette maladie est estimé à 744 \$ par animal au Canada, ce qui constitue un fardeau considérable pour les agriculteurs (Jamali *et al.*, 2018).

### 1.1.1.2 Pathologie

La mammite bovine issue d'une infection avec une bactérie pathogène débute habituellement par son entrée par le trayon. Cette entrée se fait souvent suite à la traite, lorsque le canal du trayon n'est pas complètement refermé, ou lors de la période de tarissement lorsque le bouchon de kératine, qui protège habituellement le trayon, est affecté (Fox et Norell, 1994; Dingwell *et al.*, 2002; Bhutto *et al.*, 2010). Le degré d'adhésion à l'épithélium du sinus du trayon varie d'un microorganisme à l'autre, mais celui-ci doit tout d'abord résister au flux de lait avant de s'étendre dans le quartier, affectant ainsi l'épithélium des canaux galactophores.

La présence de ces microorganismes, de leur sécrétion de molécules (toxines, quorum sensing, etc.), ou même les dommages causés aux tissus de la glande mammaire, activent les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN), déjà présents dans le lait de façon normale à un taux environnant quelques dizaines de milliers de cellules par millilitres. D'autres PMN vont migrer du sang au lait pour participer à l'élimination des bactéries pathogènes, ce qui élève leur concentration parfois à quelques millions par millilitres (Strandberg *et al.*, 2005). Cet afflux de PMN depuis le sang affecte l'intégrité cellulaire, endommageant encore plus l'épithélium de la glande mammaire et altère la barrière sang-lait.

Des symptômes, liés à la fois à la réaction immunitaire et à la présence d'une bactérie pathogène, peuvent alors apparaître, comme une inflammation du quartier affectée, de la fièvre, une apparence du lait modifiée (lait en eau, flocons, sang) et des changements comportementaux. Cependant, il est estimé qu'environ 40 % des vaches sont plutôt atteintes

de mammites sous-cliniques, qui ont la particularité de ne démontrer aucun symptôme visible autre qu'une élévation dans le CCS, tel que suggéré par Dufour (Communication présentée au Colloque sur la santé des troupeaux laitiers, Drummondville, 2008).

Les bactéries pathogènes causant la mammite peuvent soit provenir de l'environnement de la vache ou être transmis d'une vache infectée lors de la traite si les agriculteurs n'utilisent pas les techniques de prévention adéquates (Godden *et al.*, 2008; Mallet *et al.*, 2012). Il y a plusieurs facteurs de risque, comme une forte production laitière (Lescourret *et al.*, 1995; Allore et Erb, 1998; Bar *et al.*, 2007; Heravi Moussavi *et al.*, 2012) ou un cas de mammite ayant eu lieu lors d'une lactation ultérieure (Pantoja *et al.*, 2009; Pinedo *et al.*, 2012). Les vaches multipares, ayant eu plusieurs veaux, sont aussi plus à risque de souffrir de mammites récurrentes que les vaches primipares (Wolf *et al.*, 2010; Hertl *et al.*, 2011).

### **1.1.2 La mammites bovine causée par *Staphylococcus aureus***

#### **1.1.2.1 Épidémiologie**

La prévalence des mammites causées par *S. aureus* varie d'un pays à l'autre, ainsi que d'une ferme à l'autre selon les mesures de prévention adoptées. De plus, avec les récentes découvertes suggérant que *S. aureus* ferait partie du microbiote du lait chez la vache, il devient plus complexe de faire la distinction entre une infection et une colonisation normale (Oikonomou *et al.*, 2014). Par exemple, des études menées en Allemagne et en République tchèque montraient une prévalence de vaches positives pour *S. aureus* de 5,7 % et de 29,7 % respectivement (Tenhagen *et al.*, 2006; Vlkova *et al.*, 2017). Une autre étude menée aux États-Unis visait à échantillonner plusieurs sites à la ferme, dont des mouches (*Haematobia irritans*), pour voir s'ils retrouvaient des sites de prélèvements positifs pour *S. aureus*. Au total, 19,9 % des sites étaient positifs, dont 13,6 % pour le lait et 55,8 % pour les mouches. De plus, des 12 génotypes identifiés, certains se retrouvaient à la fois dans le lait et les mouches, démontrant un possible échange entre ces deux sites (Anderson *et al.*, 2012). Au Québec, l'analyse du lait des citernes de 117 fermes a révélé que 76,8 % à 90,6 % des fermes étaient positives pour la présence de cette bactérie pathogène (Francoz *et al.*, 2012). Cependant, pour toutes ces études, les échantillons provenaient de vaches ne démontrant aucun signe de mammites, ce qui mène à la question : était-ce une colonisation pré-infectieuse ou simplement une souche faisant partie du microbiote de ces laits?

Lorsque ce sont des vaches atteintes qui sont examinées, les résultats sont tout de même similaires. Au Canada, *S. aureus* est l'une des bactéries pathogènes les plus fréquemment

isolées de cas de mammites (Fox et Gay, 1993; Reyher et Dohoo, 2011). En Ontario, sur 834 vaches atteintes de la mammite, environ 51 vaches étaient positives pour la présence de *S. aureus* (Sargeant *et al.*, 1998). Dans l'état de New York aux États-Unis, la prévalence de *S. aureus* chez des vaches atteintes était plutôt autour de 12,5 % (Oikonomou *et al.*, 2012), tandis qu'en Iran les chiffres augmentent à 20,1% (Jamali *et al.*, 2014). Ces chiffres grimpent en Éthiopie, où 73,2 % des troupeaux atteints de mammites sont positifs pour la présence de *S. aureus*, démontrant un lien entre les mesures de prévention et la présence de la bactérie pathogène (Abebe *et al.*, 2016). La prévalence de *S. aureus* varie donc grandement, mais cette bactérie demeure l'une des plus fréquemment retrouvées dans les échantillons de lait et constitue, en considérant sa virulence, un problème majeur au niveau de l'industrie laitière.

### 1.1.2.2 Les mammites cliniques et sous-cliniques

Il existe deux types de mammites, indépendamment du type de microorganisme pathogène associé. Les mammites cliniques sont plus flagrantes et les symptômes sont plus apparents. En plus du CCS élevé, il y a une inflammation du quartier affecté, des modifications au niveau de l'apparence du lait (caillots, apparence aqueuse, etc.) et une baisse de la production laitière. Dans les cas plus sévères, les symptômes deviennent systémiques, causant de la fièvre, de la déshydratation et des modifications au niveau du comportement de l'animal (refus de s'alimenter, agressivité causée par la douleur, etc.). Les mammites sous-cliniques sont plus subtiles et ne causent aucune modification au niveau de l'apparence du lait et du pis. La quantité ainsi que la qualité du lait peuvent être modifiées, mais de façon moindre que dans les cas cliniques (National Mastitis Council, 2013). Pour diagnostiquer une mammite sous-clinique, le CCS est utilisé. Au Canada, les réglementations exigent que le CCS du lait contenu dans la citerne soit de moins de 400 000 cellules/ml. En 2005, les chiffres tournaient autour de 230 000 cellules/ml, avec 5 % des troupeaux au-dessus de 400 000 cellules/ml (More, 2009; Réseau canadien de recherche sur la mammite bovine et la qualité du lait). En Amérique du Nord, il a été démontré que des quartiers non infectés ont généralement un CCS autour de 70 000 cellules/ml (Dohoo et Leslie, 1991; Schepers *et al.*, 1997; Djabri *et al.*, 2002). Dans un cas de mammite (clinique et sous-clinique), le CCS grimpe, et bien qu'il soit variable d'une IIM à l'autre, un seuil est couramment inscrit entre 200 000 et 250 000 cellules/ml, et les quartiers dont le CCS est supérieur à ce seuil sont considérés comme étant atteints d'une mammite (Schukken *et al.*, 2003).

Les mammites causées par *S. aureus* prennent souvent une forme sous-clinique (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010). En analysant la littérature, la prévalence de *S. aureus* à l'origine de mammites sous-cliniques varie de 12 à 60 % mondialement (Giannechini *et al.*, 2002, Persson *et al.*, 2011; Hegde *et al.*, 2013; Elhaig et Selim, 2015; Sztachńska *et al.*, 2016; Mpatwenumugabo *et al.*, 2017; Sağlam *et al.*, 2017). Ceci est problématique car ces types de mammites passent souvent inaperçues, mais la transmission est toujours possible malgré l'absence de symptômes. Les animaux ne sont donc pas mis en quarantaine et les producteurs laitiers ne prennent pas les précautions nécessaires autour de ces vaches, ce qui peut augmenter le risque de transmission.

### 1.1.2.3 Pathogénèse

Il est difficile de dire, maintenant que certains articles mentionnent la présence normale de *S. aureus* dans le microbiote du lait de vaches saines, si son entrée dans la glande mammaire est toujours directement liée à l'environnement (Oikonomou *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014). Quoiqu'il en soit, *S. aureus* est régulièrement retrouvé dans l'environnement autour de la vache. Selon une étude, environ 20 % des sites échantillonnés autour de l'animal, sur l'animal, sur les fermiers et même sur les mouches étaient positifs pour la présence de la bactérie (Anderson *et al.*, 2012). De plus, les quartiers contaminés ainsi que les trayons constituent les réservoirs principaux de cette bactérie (Jain, 1979; Bramley et Dodd, 1984). Des lésions à la surface des trayons, souvent amenées par la traite, peuvent ainsi devenir des sites de persistance de la bactérie (Neave *et al.*, 1971). *S. aureus* peut donc entrer dans la glande mammaire par le trayon en y persistant et en s'y multipliant. Puis, il remonte le long du canal jusqu'à la glande mammaire par colonisation progressive ou par des changements dans la pression intramammaire, qui ont surtout lieu lors de la traite (Kerro et Nederbragt, 2002).

L'infection de la partie distale de la glande mammaire se fait, entre autres facteurs, grâce à des protéines d'adhésion produites tôt dans la phase exponentielle (Projan, 1997; Kerro et Nederbragt, 2002). Cette étape d'adhésion est cruciale pour la survie de *S. aureus* dans la glande mammaire, car la bactérie pourrait être lavée hors du quartier lors de la traite (Gudding *et al.*, 1984). Les protéines d'adhésion à la fibronectine, FnBPA et FnBPB, qui se lient à la fibronectine des cellules épithéliales sont nécessaires à ce processus (Lammers *et al.*, 1999; Brouillette *et al.*, 2003; Ofek *et al.*, 2003). Ces protéines jouent non seulement un rôle dans l'adhésion, mais aussi dans la formation de caillots bactériens qui rendent la phagocytose difficile. Elles ont aussi un rôle dans l'internalisation des bactéries dans les cellules épithéliales. Les cellules mammaires exprimant la fibronectine à leur surface se trouvent dans



les couches inférieures de l'épithélium, soit la membrane basale et autour des cellules myoépithéliales et des fibroblastes (Asch *et al.*, 1981). Pour s'y lier, *S. aureus* doit donc passer ces couches épithéliales. En entrant dans la glande mammaire, la bactérie produit une panoplie de composés qui entraînent une inflammation. C'est cette inflammation qui endommage l'épithélium mammaire, puis permet l'accès de *S. aureus* aux cellules exprimant la fibronectine (Lammers *et al.*, 1999). Après cette adhésion à la fibronectine, la bactérie lie aussi les intégrines, ce qui mène à son internalisation dans les cellules mammaires (Finlay et Falcow, 1997; Ozeri *et al.*, 1998). D'ailleurs, *S. aureus* a la capacité d'intégrer plusieurs types cellulaires: cellules endothéliales, les fibroblastes et les ostéoblastes, ainsi que dans certaines cellules sécrétrices (Hamill *et al.*, 1986; Hudson *et al.*, 1995; Almeida *et al.*, 1996; Jevon *et al.*, 1999; Fallgren *et al.*, 2001).

Une fois l'étape de colonisation passée, *S. aureus* peut produire une gamme de facteurs qui affectent la santé de la glande mammaire. Il est estimé qu'environ 40 toxines extracellulaires, enzymes et protéines de surface sont nécessaires à la pathogénicité de *S. aureus*, et ces toxines sont divisées en 3 catégories : celles importantes pour l'adhésion aux cellules hôtes, celles qui causent des dommages tissulaires et celles qui protègent les bactéries du système immunitaire (Arvidson and Tegmark, 2001; Kerro et Nederbragt, 2002).

Du côté des dommages tissulaires, les hémolysines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  produisent des pores dans la membrane cytoplasmique des globules rouges, ce qui libère des nutriments et du fer nécessaire à *S. aureus* (Bramley *et al.*, 1989; Kerro et Nederbragt, 2002). De plus, 20 à 50 % des souches

isolées de cas d'IIM produisent une  $\alpha$  toxine qui crée des pores dans les cellules épithéliales (Sutra et Poutrel, 1994; Cifrian *et al.*, 1995). La  $\beta$  toxine, aussi connue sous le nom de sphingomyélinase C, est produite dans 75 à 100 % des souches isolées d'IIM (Sutra et Poutrel, 1994). Cette toxine forme aussi des pores dans les cellules, ce qui mène éventuellement à la mort cellulaire suite aux fuites cytoplasmiques. Les tissus mammaires sont alors endommagés, et les capacités sécrétoires des cellules sécrétrices sont diminuées (Capuco *et al.*, 1985; Cifrian *et al.*, 1996). Ensemble, les toxines  $\alpha$  et  $\beta$  démontrent des effets cytotoxiques additifs : la  $\beta$  toxine altère les cellules sécrétrices mammaires, ce qui rend la  $\alpha$  toxine plus dommageable, qui à son tour promeut l'adhésion de *S. aureus* et sa prolifération (Cifrian *et al.*, 1996).

*S. aureus* produit aussi des entérotoxines, des protéines extracellulaires composées d'une chaîne polypeptidique d'environ 30 kDa. Il en existe plusieurs, et environ 50 % des souches en produisent plus qu'une (Larsen *et al.*, 2000; Stephan *et al.*, 2001). Ces entérotoxines font partie de la famille des superantigènes, et ont la capacité de lier le complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH-II) ainsi que des segments V $\beta$  et  $\alpha\beta$  des récepteurs des lymphocytes T (Kappler *et al.*, 1989; White *et al.*, 1989; Papageorgiou et Acharya, 2000). Les superantigènes ont la capacité de suractiver les lymphocytes T, ce qui mène à une production massive de cytokines. La réaction immunitaire est donc disproportionnée, ce qui induit de forts déséquilibres dans l'homéostasie générale (Llewelyn and Cohen, 2002).

Pour se protéger du système immunitaire, *S. aureus* s'internalise dans les cellules hôtes, produit du biofilm, et produit des facteurs antiphagocytiques (capsule et protéine staphylococcal A) (Almeida *et al.*, 1996; Kerro et Nederbragt, 2002; Beeken *et al.*, 2010). Il peut se défendre via, par exemple, la production de leucocidines qui ont un effet cytolytique sur les macrophages et les neutrophiles (Loeffler *et al.*, 1986). La production de biofilm quant à elle peut non

seulement protéger les bactéries du système immunitaire, mais aussi des antibiotiques utilisés pour traiter l'IIM (Goetz *et al.*, 2016; Melchior *et al.*, 2006; Archer *et al.*, 2011). Même si la souche est sensible à l'antibiotique *in vitro*, la production de cette matrice change le profil de susceptibilité (Melchior *et al.*, 2007).

*S. aureus* possède donc une gamme de facteurs de virulence qui aident à sa pathogénèse, et qui facilitent son installation, souvent chronique, dans la glande mammaire.

#### 1.1.2.4 Les facteurs de persistance

Les mammites causées par *S. aureus* ont la particularité d'être difficile à traiter, en plus de démontrer parfois une certaine chronicité. En effet, *S. aureus* a la capacité de produire du biofilm ainsi que plusieurs facteurs de virulence qui aident à son évaison du système immunitaire (Beeken *et al.*, 2010). De plus, tel que décrit plus tôt, il a déjà été observé que certaines souches de *S. aureus* ont la capacité d'infecter et de survivre à l'intérieur de différents types cellulaires, de s'y répliquer, d'échapper à l'endosome et d'induire l'apoptose (Baselga *et al.*, 1994; Almeida *et al.* 1996; Bayles *et al.* 1998; Qazi *et al.* 2001; Brouillette *et al.* 2003; Atalla *et al.* 2010;).

Ce type d'internalisation est plus particulièrement lié à l'adoption d'un phénotype nommé *small-colony variant* (SCV), qui favorise la persistance sur la virulence (Brouillette *et al.*, 2004; Proctor *et al.*, 2006). Ce phénotype est caractérisé par une chaîne de transport d'électron altérée, ce qui confère aux SCVs un métabolisme ralenti et une expression moindre de facteurs de virulence invasifs (Proctor *et al.*, 2006). La persistance des SCVs a souvent été liée à des infections chroniques chez les humains et les animaux, dont certaines infections intramammaires (IIM) chroniques chez le bovin laitier (Sompolinsky *et al.*, 1974; Proctor *et al.*, 2006; Atalla *et al.*, 2011).

Plusieurs études ont tenté de déterminer les gènes de souches de *S. aureus* retrouvées dans des cas de mammites persistantes. Bien qu'ils ne vinrent à aucune conclusion claire, les souches portant les gènes *sed* (entérotoxine staphylococcal D), *sej* (entérotoxine staphylococcal J) et *blaZ* (gène de bêta-lactamase) sur le même plasmide étaient plus

régulièrement retrouvées lors de cas d'IIM persistante (Haveri *et al.*, 2007; Veh et al., 2015; Pichette-Jollette et al., 2018; Wilson et al., 2018).

#### 1.1.2.5 Les interactions polymicrobiennes impliquant *S. aureus*

*S. aureus* est un microorganisme pathogène qui fait partie de plusieurs communautés bactériennes commensales. Il colonise les narines antérieures de façon asymptomatique chez 20% de la population, 60% sont temporairement hôtes, et 20% sont rarement ou jamais colonisés (Williams, 1963). Même si les narines sont souvent le réservoir principal de *S. aureus*, la bactérie se retrouve également dans le microbiote de la peau, du vagin, du rectum et du tractus gastro-intestinal, où il agit en tant que pathobionte, soit un commensal opportuniste (Wertheim *et al.*, 2005; Huttenhower *et al.*, 2012).

*S. aureus* peut causer une variété d'infections, au sein de divers organes. Il peut infecter la peau, les voies urinaires, les tracts intestinaux et respiratoires, et être la cause des mammites, méningites, du syndrome du choc toxique, et d'une variété d'autres infections des muqueuses (Götz *et al.*, 2006; McCaig *et al.*, 2006). C'est cette diversité de sites d'infections qui rend *S. aureus* étonnamment virulent et dangereux, et comme il infecte plusieurs sites, sur différents hôtes, *S. aureus* doit interagir avec les microbiotes présents sur les sites d'infections ou même avec d'autres organismes pathogènes dans certaines infections déjà en cours, et agit différemment qu'en monoculture. *S. aureus* peut effectivement prendre part à des infections polymicrobiennes lors desquelles il entretient des relations d'entraide ou d'antagonisme (Nair *et al.*, 2014). Il peut par exemple coopérer avec *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae* et le virus de la grippe (Ray *et al.*, 2003; Finelli *et al.*, 2008; Harriott et Noverr, 2009; Margolis *et al.*, 2010). Par contre, il rentre en relation de compétition avec *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus* sp., *Helicobacter kunzii* et les *Corynebacterium* (Regev-Yochay *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Filkins *et al.*, 2015; Ngba *et al.*, 2017) Quel que soit le type de relation adopté, *S. aureus* agit de manière différente qu'en monoculture, ce qui rend l'étude des interactions polymicrobiennes de *S. aureus* pertinente.

#### 1.1.2.5.1 *Enterococcus faecalis*

Chez l'humain, *E. faecalis* et *S. aureus* sont tous les deux des bactéries pathogènes et opportunistes qui se retrouvent dans l'intestin, dans les tracts respiratoires et urinaires, ainsi qu'au sein d'ulcères plantaires (Ray *et al.*, 2003). Ces deux microorganismes peuvent aussi se retrouver dans d'autres environnements comme, par exemple, le lait de vache cru et certains fromages (Viçosa *et al.*, 2018). Leur relation est ambiguë puisqu'ils peuvent à la fois s'entraider ou entrer en compétition.

D'un côté, *S. aureus* peut acquérir des gènes de résistance à la vancomycine grâce à *E. faecalis*, lors du transfert horizontal du transposon Tn1546 contenant le gène *vanA* (Clark *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2010). Ce transposon est présent sur un plasmide nommé pAM830 qui s'active lors de la sécrétion de cAM373, une phéromone sécrétée par des souches d'*E. faecalis* n'ayant pas le plasmide (Flannagan *et al.*, 2003). Ceci active alors le processus de conjugaison, ce qui permet à la cellule réceptrice d'acquérir le gène de résistance à la vancomycine *vanA* (Flannagan *et al.*, 2003). *S. aureus* a la capacité d'induire ce processus de conjugaison via la sécrétion du peptide staph-cAM373, qui ressemble grandement au peptide sécrété par *E. faecalis* (Muscholl-Silberhorn *et al.*, 1997).

D'un autre côté, il a été démontré que l'expression de gènes de virulence était nettement diminuée chez *S. aureus* lors d'une expérience de coculture avec *E. faecalis* (Viçosa *et al.*, 2018). Lors d'une coculture de 24 heures dans du lait reconstitué (10 g de lait en poudre dans 100 ml d'eau) les gènes du système *agr*, un système de quorum sensing central dans

l'activation de la virulence chez *S. aureus*, n'étaient pas exprimés comparativement au témoin *S. aureus* seul. De plus, l'expression des gènes des entérotoxines de *S. aureus* était elle aussi diminuée ou absente en coculture. Bien qu'ils ne concluent pas qu'il s'agirait d'un effet direct d'*E. faecalis*, il peut s'agir d'une réaction à l'acidification du lait ou à l'environnement redox que crée *E. faecalis*. Comme mentionné dans la section sur les bactéries lactiques, *S. aureus* est équipé de gènes détecteurs qui inhibent le système *agr* lorsque l'environnement est trop réduit (Yarwood *et al.*, 2001).



#### 1.1.2.5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bien que la relation entre *P. aeruginosa* et *S. aureus* soit compétitive, ils sont régulièrement identifiés simultanément dans des cas de blessures, de brûlures, sur des cathéters, dans le péritoine de patients en dialyse, ainsi que dans les poumons de personnes atteintes de la fibrose kystique (FK) (Holley *et al.*, 1992; Nair *et al.*, 2014). De plus, certaines études démontrent une évolution vers une coopération entre certaines souches qui peuvent s'entraider dans des contextes précis.

*P. aeruginosa* produit une gamme de toxines qui bloquent la chaîne de transport des électrons chez *S. aureus*, parmi lesquelles la pyocyanine, le cyanure d'hydrogène et le N-oxyde d'alkyle d'hydroquinoline, affectant ainsi la croissance de *S. aureus* et d'autres staphylocoques (Biswas *et al.*, 2009). Chez *S. aureus*, l'inhibition de la chaîne de transport d'électron résulte en une transition vers un phénotype SCV, auxotrophe pour l'hémine ou le ménadione, et généralement plus persistant (Vaudaux *et al.*, 2006). Ces SCVs, du fait de leur potentiel membranaire diminué, sont particulièrement résistants aux antibiotiques, tout particulièrement les aminosides (Melter et Radojevic, 2010).

Qui plus est, *P. aeruginosa* produit une endopeptidase nommée LasA spécifique à *S. aureus*. Cette peptidase coupe les liens glycyl-glycine et glycyl-alanine du pont pentaglycine du peptidoglycane, ce qui amène à une lyse de *S. aureus* (Kessler *et al.*, 1993). Chez des rats, il a été démontré que cette lyse permettait le relâchement du fer contenu dans certaines protéines de *S. aureus*, ce qui le rend disponible pour *P. aeruginosa* (Mashburn *et al.*, 2005).

Lors d'expériences de co-cultures, il a aussi été observé que les biofilms produits étaient plus épais qu'en culture individuelle (Fugère *et al.*, 2014). En outre, sous microscope atomique, il a été démontré que *S. aureus* lie plus intensément ses substrats lorsque la bactérie est en coculture avec *P. aeruginosa*. En analysant ces liaisons, il a été démontré que des adhésines riches en sérine, des protéines de liaisons extracellulaires et d'autres protéines d'adhésion étaient sûrement à l'origine de ce phénomène (Kumar et Ting, 2015).

Puisque ces deux bactéries sont fréquemment retrouvées ensemble, des chercheurs se sont intéressés à la possibilité d'adaptation des deux souches. L'équipe de Michelsen a donc utilisé une souche de *P. aeruginosa* (DK2) fréquemment isolée de patients atteints de la fibrose kystique pour voir comment la souche interagissait avec *S. aureus*. Cette souche DK2 provenait d'une collection avec plusieurs temps d'isolement, la première ayant été isolée en 1973 et la plus récente en 2008. Les « vieilles » souches de DK2 inhibaient *S. aureus* en coculture, tandis que les souches récentes semblaient avoir une relation commensale avec *S. aureus*. Ceci peut s'expliquer par une mutation adaptative dans le gène de quorum sensing *lasR*, qui amène aussi une diminution des transcrits liés à des facteurs de virulence comme les sidérophores, les exotoxines, les pyocines et autres (D'Argenio *et al.*, 2007). De plus, ils ont aussi remarqué un changement vers un phénotype SCV chez *P. aeruginosa* en culture sur des géloses contenant des concentrations inhibitrices d'antibiotique (tobramycine, gentamicine, et ciprofloxacine) et du surnageant d'une culture de *S. aureus* JE2 filtrée. Cet effet est probablement lié à une molécule du système agr chez *S. aureus* JE2 WT puisque d'autres surnageants de *S. aureus* n'ont pas eu cet effet (Michelsen *et al.*, 2014).

Une autre équipe a réussi à développer un modèle de blessure adéquat pour étudier les interactions entre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ils ont d'abord démontré une augmentation de la

résistance, de façon synergique, à la gentamicine et à la tétracycline chez *S. aureus* en croissance planctonique avec *P. aeruginosa*. Puis, en modèle de coculture en blessure, la résistance de *P. aeruginosa* à la gentamicine était plus élevée qu'en coculture planctonique (DeLeon *et al.*, 2014).

Il y a donc deux côtés à cette médaille, et les interactions entre *S. aureus* et *P. aeruginosa* ne sont pas simplement de nature compétitive comme le suggèrent les équipes de Michelsen et de DeLeon. C'est justement cette complexité qui rend ardue l'étude de ces deux bactéries et de leurs interactions en contexte hospitalier.

### 1.1.2.5.3 *Staphylococcus epidermidis*

Comme *S. aureus*, *S. epidermidis* est une bactérie nosocomiale et opportuniste. Cependant, *S. epidermidis* cause des infections plutôt chroniques et se retrouve régulièrement sur le matériel hospitalier où il forme des biofilms (Frank *et al.*, 2010). Ce microorganisme a plusieurs stratégies pour inhiber la croissance de *S. aureus*, comme la production de peptides auto-inducteurs (AIP), de modulines solubles dans le phénol (PSM) et de bactériocines (Malone *et al.*, 2007).

Grâce à cette production d'AIP, *S. epidermidis* a la capacité d'inhiber 3 groupes de souches de *S. aureus* ayant les systèmes *agr* de type 1, 2 et 3. Comme le système *agr* est nécessaire à la virulence de *S. aureus*, il en résulte une inhibition de l'expression des toxines ( $\alpha$ -toxine,  $\beta$ -toxine,  $\delta$ -toxine), des sérines protéases, de la DNase, de la fibrinolysine, de l'entérotoxine B et TSST-1. À l'inverse, le groupe *agr* 4 chez *S. aureus* inhibe de façon modérée les *S. epidermidis* du groupe *agr* 1 (Otto *et al.*, 2001; Lina *et al.*, 2003).

*S. epidermidis* affecte aussi le biofilm de *S. aureus* grâce à la production d'une sérine protéase (Esp) (Iwase *et al.*, 2010). Cette enzyme, seule ou en combinaison avec la  $\beta$ -défensine de l'hôte, coupe l'autolysine majeure de *S. aureus* (Atl) qui est nécessaire à la formation du biofilm (Chen *et al.*, 2013). Une étude menée par l'équipe de Sugimoto a démontré qu'Esp dégradait environ 75 protéines, dont 11 sont associées à la formation de biofilm et à la colonisation, telles que la protéine d'attachement à la fibronectine et la protéine A. Cette protéase dégrade également plusieurs protéines d'attachement cellulaire spécifique à l'humain

chez *S. aureus* comme la fibronectine et la vitronectine (Sugimoto *et al.*, 2013). De plus, les modulines PSM $\gamma$  et PSM $\delta$  coopèrent entre elles et avec le peptide antimicrobien LL-37 produit par l'hôte pour inhiber *S. aureus*. D'autres bactériocines, comme Pep5, l'épidermine, l'épilancine K7 et l'épicidine 280, sont produites par *S. epidermidis* et agissent contre *S. aureus* (Cogen *et al.*, 2010).

#### 1.1.2.5.4 Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BAL) forment un groupe composé de bactéries non-sporulantes, à Gram positif, capable de fermenter des sucres en acide lactique. En produisant de l'acide lactique, elles ont la faculté d'abaisser le pH de leur environnement jusqu'à un pH de 3,5 (Charlier *et al.*, 2009). Cette acidité constitue déjà une arme contre *S. aureus* et une panoplie d'autres bactéries. Parmi les acides organiques produits, les acides lactiques, acétiques, formiques, caproïques, butyriques et valériques ont aussi la capacité d'inhiber la croissance de *S. aureus* (Varma *et al.*, 2010). De plus, certaines BAL produisent du peroxyde, des protéines antimicrobiennes, des biosurfactants et des inhibiteurs de quorum-sensing (Ocaña *et al.*, 1999).

Les BAL colonisent une multitude de muqueuses chez l'humain, dont les tracti gastro-intestinaux et vaginaux. Par exemple, *Lactobacillus reuteri* RC-14, une bactérie qui colonise le tractus génital chez les femmes, produit deux molécules de signalisation, cyclo(L-Phe-L-Pro) et cyclo(L-Tyr-L-Pro), ces dernières interférant avec les molécules de *quorum-sensing* de *S. aureus* (Li *et al.*, 2011). Ce faisant, *S. aureus* est incapable de produire sa toxine de choc toxique (TSST-1), qui cause le syndrome du même nom. En culture avec du surnageant provenant d'une culture de *L. reuteri* RC-14, une baisse de transcription au niveau du promoteur *Ptst* est observée. En outre, l'étude démontra une baisse de transcription au niveau des promoteurs P2 et P3 du système de virulence *agr*, et ce, chez les quatre sous-groupes *agr* de *S. aureus* (I AIP, II AIP, III AIP, IV AIP).

D'autres recherches ont aussi démontré que *Lactococcus lactis*, grâce à sa capacité de réduction indépendante de l'oxygène, pouvait interférer avec le système *agr* (Nouaille *et al.*, 2014). Bien que le mécanisme n'ait pas encore été complètement démystifié, il semblerait que cette baisse de transcription au niveau du système *agr* soit causée par un ou plusieurs gènes détecteurs appartenant à *S. aureus*. Par exemple, SrrAB régule à la baisse le système *agr* en condition anaérobie et en présence d'un fort potentiel redox (Throup *et al.*, 2001; Yarwood *et al.*, 2001). Néanmoins, même avec leur mutant *srrA*, l'effet était reproduit (Nouaille *et al.*, 2014).

Une variété importante de protéines antibactériennes est produite par les BAL. Les plus efficaces contre *S. aureus* sont la nisine, produite par *Lactococcus lactis*, la pédiocine, produite par *Pediococcus acidilactici* et la lacticine 3147, produite par *Lactococcus lactis* DPC 3147 (Dridet *et al.*, 2006; Charlier *et al.*, 2009). Ces protéines affectent surtout la membrane et la capsule de *S. aureus*, en interférant avec sa formation ou en y créant des pores. Pour se défendre, *S. aureus* sécrète des bactériocines qui sont nuisibles aux BALs, comme la staphylococcine Au-26, Bac1829, BacR1, l'auréocine A70 et l'auréocine A53 (Crupper et Iandolo, 1996; Netz *et al.*, 2002; Charlier *et al.*, 2009).

En plus de produire ces protéines antibactériennes, certaines BALs entrent en compétition avec *S. aureus* au niveau des sites d'adhésion cellulaire. Ce processus a été étudié au niveau des tracts gastro-intestinaux et urogénitaux, où il a été observé que quatre espèces (*L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. paracasei* et *L. salivarius*) ont la capacité d'interférer avec les processus d'adhésion de *S. aureus* (Zarate et Nader-Macias, 2006; Varma *et al.*, 2010). Ces interférences se font de trois façons : blocage par exclusion de l'attachement de la bactérie, compétition pour les sites d'adhésion et déplacement des bactéries déjà adhérentes. Au-delà de l'entrée en compétition avec les sites d'adhésion cellulaire, *L. paracasei* subsp. *paracasei* possède le

pouvoir d'inhiber la croissance de *S. aureus* par le biais de sa production de peroxyde (Ocaña *et al.*, 1999).



#### 1.1.2.5.5 *Corynebacterium* sp.

*Corynebacterium* spp. est une bactérie commensale s'établissant, entre autres, au sein du microbiote nasal chez l'humain. Il arrive que cette bactérie soit l'agent causal d'infections de la peau et du nasopharynx, en plus d'être identifiée dans les cas d'infections liées aux cathéters (Nair *et al.*, 2014). Les deux bactéries entrent en compétition. D'un côté, *Corynebacterium* spp. entre en compétition avec *S. aureus* pour les sites d'adhésion épithéliales (Lina *et al.*, 2003). De l'autre, *S. aureus* produit une gamme de bactériocines qui nuisent à *Corynebacterium* spp, comme Bac1829, l'auréocine A70, l'auréocine A53 et la staphylococcine 188 (Crupper et Iandolo, 1996; dos Santos *et al.*, 2002; Saeed *et al.*, 2004).

Leur relation est toutefois plus complexe. Il existe même une hypothèse selon laquelle *S. aureus* changerait vers un phénotype commensal en présence de *Corynebacterium striatum* (Ramsey *et al.*, 2016). Lorsque *S. aureus* est mis en coculture avec *C. striatum*, la bactérie semble prendre un phénotype plus proche de la colonisation que de la virulence. Il y a une diminution de l'abondance des transcrits liés au *quorum sensing*, au système de virulence *agr*, une diminution de l'activité des hémolysines, et une augmentation des transcrits liés à la colonisation nasale, comme les gènes *metI*, *oppB*, et *sbnC* qui sont respectivement associés à la biosynthèse de méthionine, à un transporteur d'oligopeptides et à une protéine de transport du fer (Burian *et al.*, 2010). Parmi ces gènes dont l'expression était diminuée, *psmβ1* occupait la première place. Ce gène code pour une toxine de type PSM (*phenol-soluble modulin*) activement régulée par le système *agr*. En fait, la moitié des gènes dont la transcription était diminuée en coculture avec *C. striatum* était liés au système *agr*, comme les gènes accessoires de régulation A, B, C, et D. Inversement, certains gènes ont vu leur transcription augmentée, comme la protéine staphylococcal A (SpA), d'un facteur 260. Cette protéine protège *S. aureus* de l'opsonisation et de la phagocytose, de même que des *S. aureus* mutants qui ne portent pas

ce gène sont repoussées plus aisément de l'environnement nasal que les souches sauvages (Spika *et al.*, 1981; Cole *et al.*, 2016). Les chercheurs ont aussi observé une hausse du niveau d'expression des gènes *clfB* et *isdA*, qui codent respectivement pour un facteur d'agglutination et pour une protéine de transport du fer (Ramsey *et al.*, 2016). L'augmentation de l'expression de *clfB* et de *isdA* avait aussi été observée dans un modèle d'infection *in vivo* chez le rat (Burian *et al.*, 2010).

De plus, en situation *in vivo*, dans un modèle d'abcès sous-cutané chez la souris, *S. aureus* en coinfection avec *C. striatum* montrait un compte bactérien 6,2 fois plus petit qu'en situation de monoinfection. À l'inverse, *C. striatum* avait un compte bactérien 20,7 fois plus élevé en situation de coinfection (Ramsey *et al.*, 2016). Il y a donc vraiment un effet inhibiteur de *C. striatum* sur *S. aureus*. Toutefois, cela ne signifie pas que c'est nécessairement positif. Par exemple, dans la fibrose kystique, le système *agr* de *S. aureus* est compromis, mais la bactérie demeure tout de même délétère pour l'état du patient (Vaudaux *et al.*, 2006).

### **1.1.2.6 Prévention**

#### **1.1.2.6.1 Mesures d'hygiène**

Bien que des lignes directrices d'hygiène soient fortement recommandées pour diminuer les risques de mammites causée par *S. aureus*, les protocoles de nettoyage peuvent varier d'une ferme à l'autre. Tout d'abord, il est recommandé de vérifier l'aspect du lait régulièrement car il est facile de remarquer des anomalies au niveau de l'apparence de celui-ci (caillots, flocons, sang, etc.). Les vaches dont le lait n'est pas conforme devraient être testées pour la présence de *S. aureus* et mises à l'écart du troupeau si elles sont positives. Lors de la traite, le port des gants est conseillé. Il est aussi recommandé de nettoyer les pis avant la traite, puis de les assécher avant de les laver une seconde fois avec une solution désinfectante à base d'iode. Un temps de contact est préconisé (environ 30 secondes) avant de l'essuyer. Le tissu utilisé pour laver le pis ne devrait jamais être utilisé sur plus d'un animal. Suite à la traite d'une vache, l'utilisation d'un système de rétro-nettoyage (backflushing) est suggérée. Ce système permet de nettoyer les gobelets avant de passer à un autre animal, minimisant ainsi la contamination croisée. Après la traite, un bain post-traite, comme de l'iode, est conseillé (Rasmussen *et al.*, 1992; Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

Le système de traite est un réservoir pour le transfert de bactéries d'une vache à l'autre. La contamination d'un animal via contamination croisée est à l'origine de 40 % des nouveaux cas de mammites selon le « National Mastitis Council ». Les machines de traite devraient avoir une succion idéale sans endommager les trayons. Des irrégularités dans l'aspiration peuvent causer un refoulement de lait, amenant les bactéries présentes au niveau du trayon, par exemple

dans des lésions préexistantes, plus haut dans le canal et jusque dans la glande mammaire (Halleron, 1997). Ainsi, une maintenance régulière de l'équipement est nécessaire pour réduire les risques de propagation des infections.

#### 1.1.2.6.2 Antibiothérapies

Les antibiothérapies visant les mammites causées par *S. aureus* ont des taux hautement variables de réussite, soit entre 4 à 92 % selon les études (Barkema *et al.*, 2006). De plus, il semblerait que le succès de l'antibiothérapie diminue avec l'âge de l'animal ainsi que le moment où l'infection survient durant la lactation. Une étude néerlandaise a confirmé que la probabilité de réussite du traitement était effectivement liée à l'âge de l'animal, mais aussi au CCS. Un haut CCS, ainsi qu'une infection dans les quartiers arrière en début ou en milieu de lactation chez des vaches plus âgées démontraient un taux de réussite réduit (Sol *et al.*, 1997). Une étude similaire en Finlande obtenait des taux de guérison autour de 39 %, avec un taux de réussite plus élevée sous 1 million de cellules/ml (Pyörälä et Pyörälä, 1997).

Le protocole d'antibiothérapie utilisé est habituellement étalé sur 2 à 8 jours. L'antibiotique est injecté directement dans la glande mammaire en passant par le canal du trayon. Les deux antibiotiques couramment utilisés sont le ceftiofure et la pirlimycine, qui ont fait leurs preuves dans le traitement des mammites bovines causées par *S. aureus* (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

La pirlimycine a de bonnes propriétés de pénétration, ce qui lui permet d'infiltrer les tissus mammaires. L'antibiotique peut être utilisé chez des vaches sur le point de vêler, en tant qu'agent de prévention, ainsi que sur celles en lactation lorsqu'elles sont atteintes d'une mammite. Une étude a démontré que son utilisation chez des taures en prévêlage diminuait les risques de mammites suite à l'accouchement. Avant le vêlage, 10 % des taures et 3 % des quartiers étaient positifs pour *S. aureus*. Suite au vêlage, les taures positives pour la présence

de *S. aureus* composaient 5,6 % du groupe ayant reçu la pirlimycine (n = 219) versus 10 % chez les vaches témoins (n = 209) (Roy *et al.*, 2007). Chez des vaches atteintes de mammites cliniques positives pour *S. aureus* et *Streptococcus*, le taux de réussite du traitement augmentait avec la longévité de celui-ci : 44 % pour 2 jours, 61 % pour 5 jours et 95 % pour 8 jours (Gillepsie *et al.*, 2002).

De son côté, le ceftiofur est plutôt conseillé comme thérapie préventive au moment du tarissement. Cependant, il a aussi révélé des taux de guérison intéressants lors de tests sur des vaches atteintes de mammites légères et modérées. Lors d'une étude menée sur 241 vaches atteintes d'une IIM en 2014, 19 vaches étaient atteintes de mammites positives pour *S. aureus*. De ces 19, 9 ont été soignées par le traitement à base de ceftiofur (Truchetti *et al.*, 2014). Pour les mammites sous-cliniques positives pour *S. aureus*, le taux de guérison était d'environ 36 % (Oliver *et al.*, 2004).

### 1.1.2.6.3 Vaccination

Il existe d'autres moyens de prévention que l'utilisation d'antibiotiques, comme la vaccination contre *S. aureus*. Les vaccins formulés pour *S. aureus* sont principalement composés de sous-unités bactériennes (toxines, protéines de surface, polysaccharides) ou de l'organisme complet (lysats cellulaires, bactéries inactivées ou atténuées).

Dans les vaccins commercialement vendus, il existe StartVac®, aussi connu sous le nom de TopVac®, de la compagnie Hipra. Il s'agit d'un vaccin polyvalent qui contient les souches inactivées d'*E. coli* J5 et de *S. aureus* SP140 (Ismail, 2017). Cependant, plusieurs études ont démontré que la vaccination avec StartVac® ne réduisait pas significativement l'incidence et la durée des mammites dans les troupeaux testés (Landin *et al.*, 2015; Freick *et al.*, 2016). Une autre étude a montré une diminution modérée des cas de mammites causées par *S. aureus* ainsi que leur durée lors d'une expérience où les vaches étaient suivies pendant 21 mois suite à la vaccination (Schukken *et al.*, 2014). Une équipe a aussi évalué la réaction immunitaire en vaccinant des vaches, puis en infusant leurs quartiers avec une souche de *S. aureus*, précédemment tué avec du formaldéhyde. Bien que leurs résultats démontraient une réaction immunitaire moins sévère chez les vaches immunisées, l'utilisation d'une souche déjà tuée ne permet pas de démontrer les capacités réelles du vaccin (Piepers *et al.*, 2017).

Il existe aussi MastaVac® de LG Life Sciences, un vaccin recombinant pour l'entérotoxine staphylococcal C (*sec*). Pour tester l'efficacité du vaccin, les quartiers des vaches testées ont été infusés avec 50 unités formatrices de colonie (UFC) de la souche *S. aureus* 409 pour créer

une mammite sous-clinique. Le CCS était significativement plus bas chez les vaches vaccinées, et aucune colonie de *S. aureus* n'a été isolée de leur lait. À l'inverse, 75 % des vaches non vaccinées étaient positives pour la présence de *S. aureus* (Chang *et al.*, 2008).

Il est difficile de produire un vaccin efficace contre *S. aureus* à cause d'une gamme de facteurs, comme l'internalisation cellulaire de la bactérie, sa production de biofilm, son phénotype persistant SCV, mais aussi parce qu'il existe une panoplie de souches qui infectent le bovin laitier (Atalla *et al.*, 2010; Goetz *et al.*, 2016). Il est donc important de prendre tous ces éléments en compte lors de la confection d'un vaccin.

En 2013, le laboratoire de François Malouin a publié le prologue vers la vaccination efficace des vaches contre *S. aureus* lorsqu'ils ont infecté expérimentalement des vaches avec plusieurs souches de la bactérie. Quatorze jours plus tard, ils ont récolté le lait et déterminé quels gènes étaient exprimés de façon commune chez les souches, pour identifier les protéines importantes à inclure dans la formulation d'un nouveau vaccin. Ils ont ensuite formulé un vaccin pour le tester sur des vaches (Allard *et al.*, 2013). Le groupe de vaches vaccinées répondait mieux à l'infection expérimentale subséquente avec *S. aureus* en démontrant un CCS et un compte bactérien plus bas que chez les vaches non vaccinées, en plus de maintenir production laitière normale et une saine apparence du lait. Depuis, l'Université de Sherbrooke et Bayer (Leverkusen, Allemagne) collaborent à l'optimisation de ce vaccin sous le couvert d'une licence (Malouin, 2018, <https://www.newswire.ca/news-releases/bayer-and-universite-de-sherbrooke-enter-license-agreement-to-drive-innovation-in-dairy-cattle-health-581295141.html>).



## **1.2 Le microbiote du lait de vache cru**

### **1.2.1 La voie entéromammaire**

Le lait cru a longtemps été considéré comme étant stérile, jusqu'à une contamination externe (Tolle, 1980). Bien que l'hypothèse d'une contamination externe ne soit pas impossible, il ne s'agit pas de la seule source bactérienne. Pour une vache laitière, une contamination externe s'explique relativement aisément. Les trayons n'ont qu'à être légèrement détendus après une traite pour aider le passage de bactéries qui, par exemple, pourraient se trouver dans leur litière (Gill *et al.*, 2006; Godden *et al.*, 2008; Bhutto *et al.*, 2010). Chez la femme, on expliquait souvent la contamination bactérienne du lait par la bouche et la peau du bébé. Cependant, plusieurs variables demeuraient inexplicables. Par exemple, pourquoi retrouvait-on des bactéries anaérobiques qui ne logeaient pas à la surface de la peau dans ledit lait? En fait, chez une même femme, les bactéries de la peau et du lait étaient génétiquement différentes, même si elles faisaient partie du même taxon (Martín *et al.*, 2003). Il fallait donc trouver d'autres sources de contamination.

En 2009, une équipe suggérait que la flore bactérienne humaine évoluait au cours du temps et qu'il existait plusieurs échanges bactériens entre les différentes niches du corps humain (Costello *et al.*, 2009). Il a été découvert que plusieurs bactéries ont la capacité de traverser les ganglions lymphatiques mésentériques pour rejoindre les glandes mammaires (Donnet-Hughes *et al.*, 2010; Boix-Amorós *et al.*, 2016). Une étude suggère une « permission temporaire » qui est engendrée par les changements hormonaux en fin de grossesse et en début de lactation

(Jeurink *et al.*, 2012). Ces résultats démontrent qu'il existe potentiellement une voie entéromammaire chez les femmes.

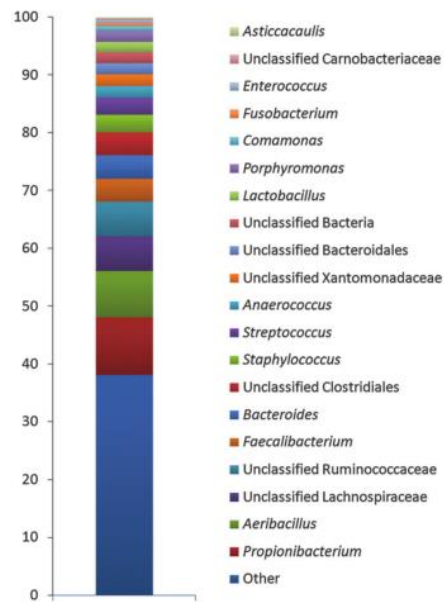
Lorsqu'on parle de microbiote, la plupart des études concernent premièrement l'être humain. Il s'agit effectivement d'une bonne source d'inspiration pour les scientifiques d'autres domaines. Si le sang et la lymphe d'une femme en fin de lactation contiennent des bactéries en migration vers les glandes mammaires, pourquoi est-ce qu'un phénomène similaire n'existerait pas chez d'autres mammifères lactifères? En 2015, l'équipe de Young fait les premiers pas dans ce sens. Ils ont exploré la diversité et la composition microbienne de plusieurs niches chez la vache : les fèces, les leucocytes du lait et les leucocytes du sang. Ils ont observé un partage d'un petit nombre d'unité taxonomique opérationnelle (OTU) identique chez les genres *Ruminococcus* et *Bifidobacterium*, et de la famille *Peptostreptococcaceae* dans les trois échantillons, suggérant que ces bactéries se retrouvaient dans ces trois niches et qu'il existait probablement un transfert entre ces sites.

### **1.2.2 Les communautés bactériennes retrouvées dans le lait de vaches considérées comme saines**

Le lait est un environnement particulièrement riche, ce qui est nécessaire pour remplir son rôle capital dans le développement d'une progéniture. Il contient différents sucres et lipides, des cellules immunitaires, des immunoglobulines, des cytokines, des protéines antimicrobiennes, des facteurs immunomodulateurs et diverses communautés microbiennes qui composent le microbiote (Walker, 2010; Jeurink *et al.*, 2012). La présence de ces bactéries dans le lait peut être expliquée par leur rôle dans la colonisation du tractus intestinale chez la progéniture. Certaines bactéries aident à la digestion du lait, d'autres acidifient le tractus intestinal pour le protéger des microorganismes nocifs, mais tous stimulent l'immunité, une étape cruciale dans l'apprentissage du système immunitaire (Field, 2005; Jeurink *et al.*, 2012). Chez le bovin laitier, comme chez les femmes, il est estimé qu'il y a environ entre 1000 et 10 000 unités formatrices de colonies (UFC) par millilitre de lait cru lorsque la glande mammaire est en santé (US Food and Drug Administration, 2009; Hunt *et al.*, 2011).

Il est difficile d'établir un standard pour nommer ce qui est un microbiote sain. Plusieurs équipes ont analysé la diversité bactérienne du lait cru provenant de vaches considérées comme saines, mais les résultats peuvent différer d'une étude à l'autre. L'équipe de Kuehn a démontré qu'à l'intérieur du même pis, deux quartiers pouvaient contenir du lait ayant une composition bactérienne différente, selon leur état de santé. De façon générale, la prévalence de *Pseudomonas*, *Psychrobacter* et *Ralstonia* était plus élevée dans les quartiers sains (Kuehn *et al.*, 2013). Cette découverte est étrange, considérant l'implication de *Pseudomonas* dans la détérioration du lait, ainsi que dans certains cas de mammites pour *P. aeruginosa* (Kirk et Bartlett, 1984; Dogan et Boor, 2003). Cela s'explique peut-être par sa présence, comme *Ralstonia*, dans l'eau, utilisée pour nettoyer les trayons (Reynolds *et al.*, 2008; Ryan *et al.*,

2011). De son côté, *Psychrobacter* a déjà été identifié dans des échantillons de lait cru lors d'autres études (Vacheyrou *et al.*, 2011).



**Figure 1 : Distribution des 20 genres bactériens les plus abondants dans 50 échantillons de lait cru provenant de vaches saines avec un compte de cellules somatiques inférieur à 20 000 cellules/ml (Oikonomou *et al.*, 2014).**

Une autre équipe a analysé le microbiote du lait cru avec, comme élément de comparaison, le compte de cellules somatiques (CCS). Quelques communautés bactériennes étaient redondantes dans chaque échantillon, peu importe le CCS, comme *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae*, *Propionibacterium* et *Aeribacillus*. *Lachnospiraceae* et *Propionibacterium*

ont aussi été retrouvés dans le lait chez certaines femmes (Jost *et al.*, 2014). À CCS bas (sous 20 000 cellules par millilitre), dans les échantillons provenant de vaches considérées comme saines, la prévalence de *Bacteroides*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, *Comamonas*, *Fusobacterium* et *Enterococcus*, était plus élevée (Oikonomou *et al.*, 2014) (Figure 1). La présence de *Staphylococcus* et *Streptococcus* dans ces échantillons de lait à bas CCS démontre une possibilité que ces espèces connues de la mammite bovine fassent partie du microbiote normal du lait, comme ils font partie du microbiote chez les humains, en tant que pathobiontes (Zadoks *et al.*, 2011; Huttenhower *et al.*, 2012).

Les différences notables dans les prévalences bactériennes associées à un lait considéré comme sain peuvent être expliquées par plusieurs facteurs comme la diète, les normes d'hygiène instaurées à la ferme et le type de litière utilisé.

### **1.2.3 Les modificateurs du microbiote du lait cru**

#### **1.2.3.1 La diète**

Dans le secteur agroalimentaire, l'optimisation des procédés est une priorité. L'alimentation des animaux a rapidement été mise sous les projecteurs. C'est connu, les aliments ingérés par l'animal influenceront le produit final, qu'il s'agisse de viande ou de lait. Dans le cas des vaches laitières, beaucoup d'études ont été menées sur l'influence de la nutrition sur la qualité du lait produit ainsi que sur sa quantité (Sutton, 1989). Par contre, ce n'est que récemment, avec l'avènement du séquençage, que des études se sont mises à faire le lien entre l'alimentation d'une vache et le microbiote de son lait. Maintenant, il y a plusieurs études qui démontrent l'effet des différentes diètes sur la composition bactérienne du lait. Il s'agit d'un sujet intéressant, que ce soit dans l'optique de produire des sous-produits laitiers de qualité comme les fromages de lait cru, ou pour s'assurer qu'une diète ne favorise pas une population bactérienne dangereuse pour la santé mammaire.

Une vache laitière a un besoin énorme en calories pour pouvoir produire du lait. Il y a donc plusieurs types de moulées optimisées pour atteindre le niveau énergétique requis à la production. Ces moulées contiennent souvent de larges fractions de céréales et de sous-produits facilement dégradables. Cependant, il a été prouvé qu'une diète de ce genre peut amener à une maladie digestive et systémique, l'acidose ruminale chronique (ARC) (Zebeli et Metzler-Zibeli, 2012). Cette acidose a pour effet une translocation de composés immunogènes du système digestif au sang, ce qui provoque une réaction inflammatoire systémique. Cette réaction en chaîne produit des réactions immunitaires locales et endommage les tissus, comme

par exemple, les cellules des trayons. Ce bris de barrière avec l'extérieure peut amener à une entrée de bactéries dangereuses (Sordillo et Streicher, 2012). En 2015, une équipe a donc voulu comparer le microbiote du lait cru de vaches nourries avec une diète qui induit l'ARC (HC, avec 70% de moulée concentrée) et une diète contrôle (LC, avec 40% de moulée concentrée) (Zhang *et al.*, 2015). Ils se sont assurés d'induire l'ARC chez les vaches nourries avec la diète HC, puis ils ont analysé les communautés bactériennes du lait.

Bien qu'au niveau des phylums, ils n'ont pas trouvé de différences majeures, les genres étaient modifiés d'une alimentation à l'autre. Parmi les plus notables ( $p > 0,05$ ), il y avait une augmentation de *Stenotrophomonas*, *Sphingobium*, *Pseudomonas* et *Enterobacter*, et une diminution de *Chryseobacterium* et *Butyrivibrio* chez les vaches nourries avec une diète HC. Les genres augmentés par ce type d'alimentation sont potentiellement dangereux pour la santé de la vache. Par exemple, *Stenotrophomonas*, un genre qui augmente lors d'une mammites (Kuehn *et al.*, 2013) et qui a déjà été lié à des cas de mammites au Japon (Ohnishi *et al.*, 2012), est reconnu pour sa capacité à dégrader la kératine qui protège le trayon (Yamamura *et al.*, 2012). Cette même équipe avait aussi étudié l'impact d'une alimentation HC sur le microbiote des fèces et y avait trouvé une forte proportion de *Stenotrophomonas* (Mao *et al.*, 2012). Les fèces peuvent aisément rentrer en contact avec les trayons, et ainsi contaminer la glande mammaire, ce qui expliquerait possiblement cette augmentation. De leur côté, *Enterobacter* et *Pseudomonas* produisent des protéases et des lipases thermorésistantes reconnues pour leurs rôles dans la détérioration du lait (Munsch-Alatossava et Alatossava, 2006; Hantsis-Zacharov *et al.*, 2007). Ces résultats vont de pair avec d'autres études qui ont démontré que le lait sur les fermes dites conventionnelles, où les vaches sont nourries avec des moulées concentrées, contenait beaucoup plus de microorganismes thermotolérants (Vaerewijck *et al.*, 2001; Coorevits *et al.*, 2008). De plus, ces moulées contiennent énormément de spores, jusqu'à  $10^6$  par gramme. Celles-ci résistent au passage à travers le tractus intestinal et se retrouvent alors dans les fèces de la vache. Ces spores peuvent être ainsi transférées au lait lors d'une

contamination fécale du pis. Il a aussi été démontré que le lait de vaches nourries avec ces moulées contenait beaucoup plus de microorganismes inconnus, ce qui pourrait s'expliquer par les ingrédients importés provenant de divers pays (Coorevits *et al.*, 2008). Du coup, même si cette diète compense au niveau énergétique, elle peut s'avérer dangereuse pour la santé mammaire de la vache, raccourcir la durée de conservation de lait et diminuer ses qualités organoleptiques.

Ces diètes HC sont souvent utilisées pour optimiser l'alimentation dans des fermes à larges troupeaux. On pourrait donc s'attendre à ce qu'une alimentation dite organique et/ou à base d'ensilage soit plus adéquate au niveau du microbiote du lait. Cependant, peu importe le type d'alimentation, le microbiote est tout de même modifié. Par exemple, l'ensilage contient une quantité non négligeable de spores qui peuvent contaminer le lait (Te Giffel *et al.*, 2002). L'ensilage est en fait un processus de préservation d'un mélange de fourrage (souvent de l'herbe, du maïs et de la luzerne) obtenu à partir d'une fermentation lactique rapide à bas pH sous condition anaérobie. En principe, les bactéries lactiques vont dominer les bactéries indésirables, mais il y a parfois la prolifération de moisissures, des bacilles, de *Listeria* et d'*Enterobacteriaceae*. Ces contaminations dégradent les qualités nutritives de l'ensilage, mais représentent également un risque pour la santé de l'animal (Driehuis et Elferink 2000).

Dans une étude menée par Giffel en 2002, des bactéries sporulantes appartenant aux genres *Clostridium* et *Bacillus* ont été isolées à partir de l'ensilage. Au total, une centaine d'UFC de spores aérobiques ont été retrouvés par gramme d'ensilage, la plupart appartenant au genre *Bacillus* : *B. cereus*, *B. lentus*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis* et *B. polymyxa*. Une étude de 2001 a même calculé que pour  $10^7$  spores de *Bacillus* dans un gramme d'ensilage, 100 spores étaient retrouvées dans un millilitre de lait cru (Vreman *et al.* 2001). Au total, 77%

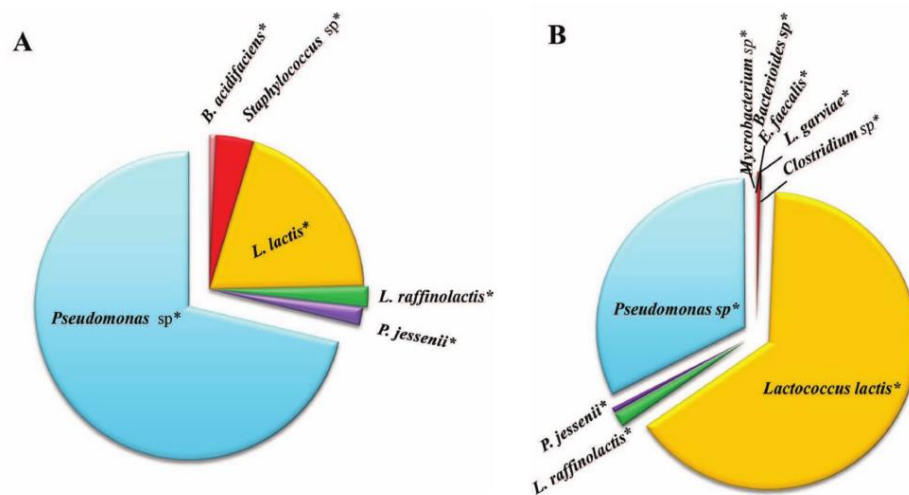


des échantillons de lait cru contenaient des spores sur les fermes où les vaches étaient nourries avec de l'ensilage (Dasgupta et Hull, 1989). Comme certaines bactéries sporulantes résistent aisément à la pasteurisation, et même à la pasteurisation de type UHT pour *B. sporothermodurans*, elles peuvent détériorer la qualité du lait ainsi que de causer des intoxications alimentaires chez les consommateurs (Huemer *et al.*, 1998; Te Giffel et Beumer, 1998).

L'alimentation des vaches a toujours été un outil intéressant pour l'amélioration de qualité organoleptique des produits finaux, ainsi qu'au niveau des qualités nutritives (Sutton, 1989). Cependant, ce n'est que récemment qu'un lien entre l'alimentation et la composition bactérienne du lait a été mis en valeur. C'est un cadre d'étude important, surtout dans la production de fromage à base de lait cru (Giello *et al.*, 2017). C'est aussi un aspect intéressant pour enrichir le lait avec certaines vitamines ou certains minéraux. La difficulté est dans la subtilité : ajouter un aspect nutritif sans favoriser une flore pathogène.

Une étude menée en 2016 par Lopez analyse justement les modifications amenées au microbiote du lait cru en fonction de l'ajout de l'algue *Ascophyllum nodosum* à l'alimentation des vaches. *A. nodosum* est utilisé depuis récemment pour fortifier la teneur en iode du lait. La carence en iode est une inquiétude présente en Europe (EFSA, 2014) et peut être délétère au développement des enfants, ainsi qu'amener d'autres problèmes de santé. Bien qu'il existe plusieurs sources d'iode, les algues marines sont des aliments à forte teneur en iode et elles sont facilement intégrées dans les rations d'aliments des vaches. *A. nodosum* est une algue de choix, car en plus d'apporter un supplément en iode, elle contient plusieurs autres nutriments comme des polysaccharides, des acides gras, des polyphénols, et plusieurs peptides

(Phaneuf *et al.*, 1999). Par contre, il existait une crainte à l'utilisation de cette algue. Et si l'iode, utilisé aussi comme désinfectant, déstabilisait le microbiote du lait cru?



**Figure 2 : Pourcentage des distributions d'OTU dans le lait témoin (A) et le lait de vaches nourries avec un supplément d'*A. nodosum* (B) (Lopez *et al.*, 2016).**

Des modifications intéressantes ont été observées en comparant le microbiote du lait témoin à celui des vaches nourries avec une supplémentation d'algue (Figure 2). Par exemple, le lait des vaches nourries avec la diète contrôle était majoritairement composé de *Firmicutes* (50,0%), de *Protéobactéries* (25,0%) et de *Bactéroidetes* (25,0%). Dans le lait des vaches nourries avec un supplément d'algues, on retrouvait plus de *Firmicutes* (57,14%), puis les *Protéobactéries*, les *Bactéroidetes* et les *Actinobactéries* étaient tous présents à 14,28%. Au niveau des genres,

une réduction du genre *Pseudomonas* a aussi été notée. C'est positif puisqu'il s'agit d'un des genres bactériens associés avec certaines mammites, mais aussi avec la diminution de la durée de la conservation (Kirk et Bartlett 1984; Dogan et Boor 2003). Une réduction du genre *Staphylococcus* spp. a aussi été remarqué (de 3,96% à 0,02%). C'est une baisse pouvant avoir un impact positif sur la santé de l'animal, puisqu'il s'agit d'un genre souvent associé aux mammites. À l'inverse, ils ont remarqué une augmentation importante du genre *Lactococcus* (64,8%) et plus précisément de l'espèce *Lactococcus lactis* (32,2%). Cette espèce est cruciale dans la production du fromage, en plus de sécréter des bactériocines importantes dans la protection contre la mammité (Vinderola *et al.*, 2000; Gill *et al.*, 2006).

### 1.2.3.2 Environnement et mesures d'hygiène

Quand on parle d'environnement dans le milieu de l'agriculture, et plus précisément dans le milieu de la production laitière, on pense rapidement à la litière. C'est effectivement l'entourage immédiat des vaches, qui passent en moyenne 40 à 65% de leur temps couchées (Manninen *et al.*, 2000; Tucker *et al.*, 2003). Si l'on prend en considération que c'est aussi la litière qui absorbe les fèces et l'urine des vaches, on comprend rapidement pourquoi celle-ci est une des premières sources de contamination du pis (Hogan *et al.*, 1999). Les divers types de litières ayant toutes des caractéristiques particulières (capacité d'absorption, type de matériaux primaires, bactéries natives, etc.), elles peuvent avoir un effet sur la contamination bactérienne. Plusieurs études essaient donc de déterminer quel type de litière est la plus adéquate en termes de confort, de contrôle de la prolifération des microorganismes pathogènes et qui n'impacte pas les populations bactériennes du lait.

Une étude menée par Zdanowicz et son équipe en 2004 cerne plutôt les populations bactériennes à la surface du trayon en fonction de la composition de la litière. Le comparatif était fait entre de la sciure de bois ou du sable. Selon leurs résultats, il y avait deux fois plus de coliformes et six fois plus de *Klebsiella* spp. sur les trayons des vaches qui avaient de la sciure de bois comme litière. Comme *Klebsiella* est une bactérie pathogène reconnue dans les cas de mammite bovine, cette découverte suggère que l'utilisation de sciure de bois comme litière peut augmenter le nombre de mammites (Oikonomou *et al.*, 2014; Podder *et al.*, 2014). De leurs côtés, les coliformes ont une facilité à dégrader certains composés organiques déjà présents naturellement dans la sciure de bois, ce qui peut expliquer leur prévalence élevée (Madigan *et al.*, 2017). Ce phénomène était aussi observé sur les litières à base de paille, où *K. pneumoniae* ainsi qu'une gamme de bactéries mésophiles, étaient plus prévalents (Michel *et al.*, 2006; Godden *et al.*, 2008). Pour les litières de sable, il y avait 10 fois plus de *Streptococcus*

spp. sur les trayons des vaches, un genre bactérien qui est aussi trouvé dans des cas de mammites (Oikonomou *et al.*, 2014). Le compte bactérien de la litière et son augmentation au fil du temps, correspondait à la quantité de bactéries présentes sur le trayon, pour la litière à base de sciure. La corrélation était moindre pour les litières de sable, possiblement à cause des propriétés physiques du sable (ex : l'adhésion et l'abrasion), mais aussi à cause d'une quantité moindre de nutriments organiques déjà disponibles avant les premiers contacts avec les fèces et l'urine de l'animal. Effectivement, même si les quartiers arrières de vaches couchées sur une litière de sable étaient plus sales, les saletés ne corrélaient pas avec une forte présence bactérienne (Zdanowicz *et al.*, 2014).

En plus de la litière, il existe d'autres choix d'accommodements, tels que les types stabulations. La stabulation désigne lorsque le bétail est maintenu saisonnièrement ou de façon permanente dans un espace restreint et clos, couvert ou non. Dans ces cas, les changements sont plutôt liés à des modifications de facteurs connus comme l'alimentation ou bien l'endroit où les vaches dorment (ex : pâturage vs étable). Les études ne s'accordent pas sur les résultats cependant. Une étude démontrait que les vaches étaient plus sales durant la transition été-hiver (à l'entrée dans l'étable), ce qui corrélait avec une augmentation du nombre de spores dans le lait (Christiansson *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 2007). À l'inverse, une autre étude montrait que le lait comptait beaucoup plus de spores en hiver à cause de la stabulation (Sutherland et Murdoch, 1994).

La contamination par des bactéries de l'environnement a été comparée sur des fermes en stabulation libre et des fermes à stabulation entravée. Le lait, la surface du trayon, l'air avant et après la traite, la poussière déposée, ainsi que le foin ont tous été échantillonnés pour évaluer quelles bactéries se trouvaient à la fois dans le lait et ces environnements. Sur les fermes à

stabulation libre, la contamination du lait par les bactéries retrouvées dans les autres échantillons était plus grande (Vacheyrou *et al.*, 2011). Ce phénomène peut être lié à d'autres facteurs, tels que le système d'aération. Des bactéries comme *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus xylosus* ont été retrouvées dans l'air de la salle de traite ainsi que dans le lait. Une contamination similaire a été observée pour la poussière, où *Aerococcus* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter amnigenus*, *Sphingomonas* sp. et d'autres ont été retrouvés, pour ensuite être observés dans le lait (Vacheyrou *et al.*, 2011).

La propreté des lieux, l'absence ou la présence d'un système d'aération adéquat, ainsi que l'utilisation de protocoles de nettoyage sont tous des facteurs d'hygiène. Sur les fermes laitières, le développement de protocoles de routines liés au nettoyage des mains et des trayons est crucial à la prévention de la mammite bovine, mais est aussi important pour la réduction des flores d'altérations qui détériorent le lait.

Le lait provenant de fermes où les normes d'hygiène sont élevées (nettoyage des trayons avant et après la traite, aération adéquate, mangeoires et salles de traite propres, et décontamination des machines de traite) avait une diversité bactérienne basse, avec une forte prévalence de *Corynebacterium casei*, une bactérie faisant partie du microbiote du trayon (Verdier-Metz *et al.*, 2009). Des membres du genre *Kocuria* et l'espèce *Brevibacterium linens* y étaient aussi présents, comme dans le microbiote du lait des rennes et des cerfs d'eau, ce qui peut suggérer qu'ils font partie d'un microbiote commun chez les ruminants (Li *et al.*, 2017). D'autres échantillons de lait provenant de fermes appliquant des normes d'hygiène moins strictes (nettoyage insuffisant des trayons avant et après la traite, décontamination inadéquate de la machine de traite, et une propreté générale moindre) montraient d'autres communautés

bactériennes comme une présence accrue de coliformes et des membres du genre *Acinetobacter* (*A. baumannii* et *A. junii*) (Verdier-Metz *et al.*, 2009; Monsallier *et al.*, 2012). *Acinetobacter* se trouve à la surface de la peau, dans la terre, et il est connu qu'il est plus prévalent dans le lait de vache ayant des pis sales (Kable *et al.*, 2016). Bien qu'il soit reconnu comme psychotrophe, *Acinetobacter* ne résiste généralement pas à la pasteurisation (Wang *et al.*, 2006; Raats *et al.*, 2011). Finalement, les échantillons de lait provenant de fermes ayant des normes d'hygiène médiocres (peu ou pas de nettoyage des trayons, salle de traite impropre, et stockage inadéquat du lait) montraient une prévalence élevée de bactéries liées à des cas de mammites : *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, et *Staphylococcus fleurettii*. Plusieurs organismes psychotrophes sporulants ont aussi été détectés, dont *Leuconostoc mesenteroides*, une BAL aussi retrouvé dans le colostrum chez les femmes (Hantsis-Zacharov *et al.*, 2007; Verdier-Metz *et al.*, 2009; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). Les membres du genre *Leuconostoc* peuvent être problématiques pour la transformation laitière. Ils survivent aisément sur les surfaces, et résistent aux traitements à la chaleur et aux températures froides (Hemme et Foucaud-Scheunemann, 2004).

À l'inverse, il a aussi été observé que certains microorganismes peinent à coloniser les trayons si les mesures d'hygiène sont trop intensives (Monsallier *et al.*, 2012). Ce phénomène peut être problématique pour les fermes qui cherchent à produire du fromage à base de lait cru et qui recherchent des qualités organoleptiques liées à la présence de certains microorganismes (Donnelly, 2001). De plus, il a déjà été démontré que certaines espèces bactériennes présentes sur le trayon aident à la protection contre des microorganismes pathogènes de la mammite (De Vlieghe *et al.*, 2004; Fragkou *et al.*, 2007). Des normes d'hygiène considérées inadéquates ont été liées à une prévalence plus élevée de *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Staphylococcus* spp. et des BALs, tous des microorganismes importants dans l'industrie fromagère (Desmaures *et al.*, 1997; Lafarge *et al.*, 2004; Monsallier *et al.*, 2012). Il est donc important d'adapter ces normes aux produits finaux qui sont recherchés.

### 1.2.3.3 La mammite

Tout comme chez l'humain, dont le microbiote intestinal peut devenir instable suite à une maladie ou à l'utilisation d'antibiotiques, les communautés bactériennes de lait ne sont pas à l'abri. Il a même été proposé que la mammite bovine fût de cause multifactorielle, l'une étant un déséquilibre dans les communautés bactériennes (dysbiose), ce qui favoriserait l'entrée de d'organismes pathogènes.

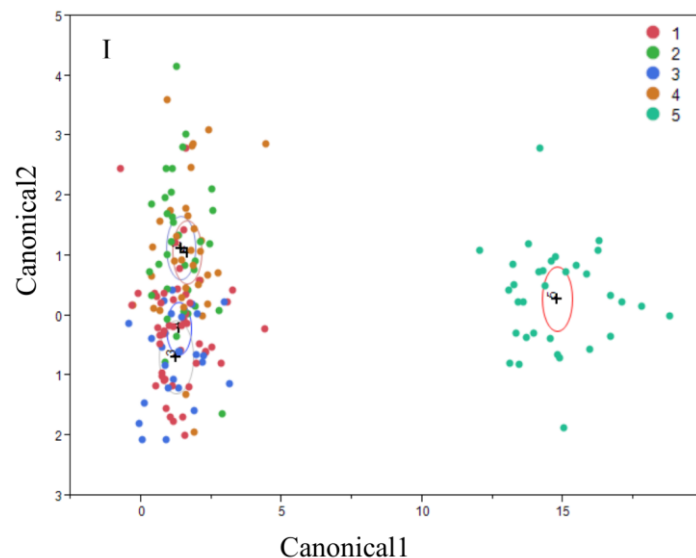
Avec l'étude du microbiote du lait cru issu de cas de mammites, certains microorganismes intéressants ont été découverts. Dans une étude menée par l'équipe d'Oikonomou en 2014, tous les échantillons provenant de cas de mammites contenaient *Fusobacterium necrophorum*. À l'inverse, l'espèce n'était pas présente dans les échantillons de lait provenant de quartiers sains. *F. necrophorum* est considéré comme une bactérie opportuniste, qui cause le syndrome de Lemierre chez les humains, et la pyomètre, une infection bactérienne utérine, chez le bovin laitier (De Giorgi *et al.*, 2017; Karstrup *et al.*, 2017). *Caulobacter leidy*, récemment renommé *Spingomonas leidy*, était aussi plus prévalent dans les échantillons provenant de mammites à culture négative, tout en étant presque absent du lait provenant de quartiers sains (Chen *et al.*, 2012). D'autres études ont déjà observé une plus forte prévalence du genre *Sphingomonas* dans des cas de mammite à culture négative (Kuehn *et al.*, 2013). À l'inverse, *Propionibacterium acnes*, *Lactobacillus johnsonii* et *S. epidermidis* étaient moins présents dans les échantillons provenant de quartiers atteints.



Une autre étude faisait la comparaison du microbiote du lait à l'intérieur de la même vache, tout en comparant un quartier sain et un quartier atteint d'une mammite à culture négative. Les quartiers atteints montraient une prévalence plus élevée de *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Stenotrophomonas* et *Sphingomonas* (Kuehn *et al.*, 2013). Tel que mentionné plus tôt, *Stenotrophomonas* a la capacité de dégrader la kératine qui protège le trayon, ce qui peut favoriser l'entrée d'autres bactéries pathogènes (Yamamura *et al.*, 2012). *Sphingomonas* est une bactérie résistante, car ces lipopolysaccharides (LPS) sont remplacés par des glycosphingolipides (GSL) (Richardson *et al.*, 1998). De plus, comme *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* a été retrouvé dans des échantillons de lait avec un CCS élevé (Nam *et al.*, 2009). *Brevundimonas* était plus abondant dans les vaches souffrant de l'ARC, en plus d'être un psychotrophe pouvant affecter la qualité du lait (Hantsis-Zacharov *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2015). De son côté, *Burkholderia* est une bactérie pathogène retrouvée chez l'humain dont l'espèce *B. pseudomallei* a déjà été retrouvée dans des échantillons de lait humain, en plus de l'espèce *B. cepacia* retrouvée dans des cas de mammites chez les moutons (Berriatua *et al.*, 2001; Ralph *et al.*, 2004).

L'écart entre la cause d'une mammite et les bactéries présentes dans le lait a été démontré lors d'une étude visant à comparer les méthodes de bactériologies traditionnelles et le séquençage de l'ADN de l'ARN 16S (Oikonomou *et al.*, 2012). En moyenne, le microorganisme découvert en bactériologie était aussi le plus prévalent lors du séquençage. C'était le cas pour *E. coli*, *Klebsiella* sp. et *S. uberis*. Cependant, pour *S. aureus*, *Trueperella pyogenes* et *S. dysgalactiae*, le séquençage montrait que la prévalence du microorganisme trouvé en bactériologie n'était pas la plus élevée. Souvent, *Fusobacterium* avait une prévalence plus élevée que ces microorganismes, démontrant la complexité des mammites.

Il demeure tout de même clair qu'une mammite induit un changement dans les communautés bactériennes du lait, tel que démontré dans la figure 3. Cette analyse de dissimilarité illustre par chaque point la composition du microbiote d'un échantillon. Les points associés aux échantillons provenant de cas de mammite sont significativement à l'écart des autres groupes, démontrant une dissimilarité accrue.



**Figure 3 : Graphique de dissimilarité représentant les 5 groupes classés en fonction du CCS (Oikonomou *et al.*, 2014).**

1 = quartiers sains avec un CCS sous 20 000 cellules/ml; 2 = quartiers sains avec un CCS entre 20 000 et 50 000 cellules/ml; 3 = quartiers sains avec un CCS de plus de 50 000 cellules/ml; 4 = quartiers atteints d'une mammite sous-clinique avec un CCS au-dessus de 400 000 cellules/ml; 5 = quartiers atteints de mammites à culture négative. Chaque point représentant un échantillon.

#### 1.2.3.4 Les antibiothérapies

L'utilisation des antibiotiques a été largement étudiée chez les humains, et les résultats montrent des changements au niveau du microbiote intestinal (Sullivan *et al.*, 2001; Dethlefsen *et al.*, 2008). Ces changements dépendent du spectre de l'antibiotique, mais aussi de la résilience et de la stabilité du microbiote. Les effets secondaires peuvent être mineurs, comme de la diarrhée ou des problèmes de digestion, ou majeurs, comme des colites pseudomembraneuses (Wilcox, 2003; Beaugerie et Petit, 2004). À la lumière de tels résultats, il est raisonnable de se demander si l'utilisation d'antibiotiques chez les vaches laitières peut déstabiliser le microbiote du lait, soit en y tuant certaines communautés directement ou en modifiant les bactéries intestinales qui, par voie entéromammaire, affectent le lait. Les antibiotiques sont utilisés massivement dans l'industrie agroalimentaire, avec comme premier but de guérir les animaux de diverses infections, mais ils sont aussi utilisés par prévention. C'est le cas des « blanket therapies » qui visent à protéger les quartiers d'une infection potentielle lors de la période de tarissement. Cette mesure préventive est coûteuse en antibiotiques, et résulte en l'utilisation de 11 millions de tonnes d'antibiotiques annuellement (FDA, 2014).

Une étude de l'équipe de Ganda en 2017 a démontré que les communautés bactériennes du lait pouvaient se rétablir suite à une infection expérimentale avec *E. coli* et un traitement avec l'antibiotique ceftiofur. Le microbiote était hautement modifié suite à l'infection expérimentale, mais se rétablissait 7 jours après le traitement avec l'antibiotique, jusqu'à être presque identique au microbiote de départ. Même dans les quartiers témoins (sans infection), ils ne remarquaient pas de changements au niveau du microbiote. Lors d'une expérience similaire en 2017, l'équipe de Bonsaglia a testé l'effet d'une « blanket therapies » avec du ceftiofur sur le microbiote du lait de vaches saines, et n'a remarqué aucune modification au

niveau du microbiote. Ces études démontrent une certaine résilience de la part du microbiote du lait.

### 1.2.3.5 La vaccination

La vaccination et le microbiote jouent des rôles similaires au niveau du système immunitaire. Pour la vaccination, on injecte une partie de l'agent infectieux, ou l'agent infectieux inactivé, pour engendrer une réponse immunitaire. Dans le cas du microbiote intestinal, celui-ci joue un rôle majeur dans la construction du système immunitaire. Il est donc intéressant de se questionner sur les effets du microbiote sur l'efficacité d'un vaccin, et si un vaccin peut influencer le microbiote. Il a déjà été observé que la réponse immunitaire induite par certaines vaccinations diffère entre personnes venant de pays développés et de pays en voie de développement (Kim, 2017). Par exemple, les vaccins contre le rotavirus, le poliovirus et le choléra sont moins efficaces dans les pays en développement (John *et al.*, 1972; Vesikari *et al.*, 1984; Patriarca *et al.*, 1991; Hallander *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2010). L'efficacité réduite de ces vaccins peut être liée à plusieurs facteurs dont la composition du microbiote.

Lors d'une étude, l'abondance d'*Actinobacteria* et de *Bifidobacteria* dans le microbiote intestinal était liée à une réponse immunitaire plus forte chez des enfants du Bangladesh ayant reçu une vaccination orale et parentérale. À l'inverse, une plus forte prévalence de *Clostridiales*, d'*Enterobacteriales* et de *Pseudomonadales* était liée à une réaction immunitaire plus faible (Huda *et al.*, 2014). Une observation similaire a été faite chez des souris traitées avec de la clarithromycine ou de la doxycycline, deux antibiotiques qui visent des espèces commensales du microbiote intestinal. Suite à ce traitement, leurs systèmes immunitaires étaient moins réactifs à un antigène de surface du virus de l'hépatite B. À l'inverse, d'autres souris traitées de la même façon montraient une réaction plus forte à un vaccin de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* atténuée (Woo *et al.*, 1999).

Bien qu'il n'existe pas d'étude sur l'influence de la vaccination sur le microbiote du lait cru, on peut émettre la théorie selon laquelle une vaccination contre une bactérie faisant partie des communautés bactériennes du lait pourrait influencer la composition de celles-ci. Par exemple, une équipe souhaitait produire un vaccin prophylactique contre *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), une bactérie nocive causant des diarrhées chez les animaux de ferme, à partir de trois antigènes provenant de régions très conservées chez d'autres souches d'*E. coli*, dont certaines font partie de plusieurs microbiotes intestinaux (Dubreuil *et al.*, 2016; Hays *et al.*, 2016). Comme certaines souches d'*E. coli* commensales sont aptes à empêcher la colonisation par certaines bactéries pathogènes selon Conway et Cohen (American Society of Microbiology, 2015), il serait logique de croire que le microbiote intestinal pourrait être affecté suite à la vaccination. Heureusement, leurs tests préalables sur des souris ne démontraient aucune modification au niveau du microbiote intestinal.

#### 1.2.4 Méthodes d'étude et d'analyse du microbiote du lait

Dans la littérature scientifique, les types d'échantillonnage, les méthodes d'extraction et les techniques de séquençage diffèrent grandement entre différents types d'échantillons : fèces, lait, terre, etc. Pour l'étude du microbiote du lait de vache cru, l'échantillonnage est plutôt similaire. Un certain volume est prélevé suite à une désinfection du quartier avec une lingette imbibée d'alcool (souvent à 70%) tout en s'assurant de jeter le premier jet.

Dans certaines études, une partie de l'échantillon est ensemencé sur des géloses, par exemple des géloses tryptic-soy (TS) avec du sang de mouton et l'esculine, et certains microorganismes sont différenciés plus amplement par d'autres tests. Par exemple, le type d'hémolyse est observé pour *S. aureus* et la forme des colonies pour *E. coli* et *Klebsiella* spp. sur des géloses MacConkey (Oikonomou *et al.*, 2012).

Pour l'extraction de l'ADN, quelques troussees reviennent souvent. Certains utilisent la trousse QIAamp DNA Minikit (Qiagen), d'autres ont opté pour Powerfood (Qiagen) ou Powersoil (Qiagen). La plupart des modifications apportées aux protocoles de base sont l'ajout de lysozyme pour s'assurer d'une meilleure extraction (Oikonomou *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014).

Pour le séquençage, certains choisissent plutôt le pyroséquençage avec le système Roche 454 GS-FLX System Titanium Chemistry (Oikonomou *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014) tandis que d'autres optent plutôt pour une technique de haut-débit Illumina MiSeq ou Illumina HiSeq (Kable *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2017). Pour préparer les échantillons au séquençage, plusieurs amorces sélectionnant pour des régions de l'ADN de l'ARN 16S peuvent être utilisées. Parmi les plus utilisées pour ce type d'échantillon, il y a celles sélectionnant pour les régions V1-V2 et d'autres pour la région V4. Les régions V1-V2 sont surtout utilisées pour la technique de pyroséquençage, avec les amorces 27F et 338R. Suite à cette première amplification universelle, les index sont ajoutés pour séparer chaque échantillon. La purification des produits se fait soit grâce à l'extraction de l'ADN après migration sur gel en purifiant une partie coupée ou en utilisant des billes de type Agencourt AMPureXP (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Avant l'envoi au séquenceur, la plupart des équipes quantifient l'ADN avec la trousse Quant-iT PicoGreen (Invitrogen), avant de faire un « pool » équimolaire pour s'assurer que chaque échantillon est représenté de façon équitable.

Les techniques d'analyse qui suivent ne diffèrent pas au niveau des analyses statistiques et la plupart utilisent R et JMP-Pro. Par contre, le type d'alignement et de traitement des données change d'une technique de séquençage à l'autre. Pour le séquençage haut-débit le pipeline Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME) est utilisé la majorité du temps pour faire la plupart de analyses, tout en alignant sur les banques de données SILVA ou Greengenes (Pruesse *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 2012). Pour être sélectionné comme étant bien aligné, un OTU devait avoir un alignement confiant à 97% dans le cadre du séquençage à haut-débit.

Pour ce qui est du pyroséquençage, les séquences étaient triées selon leurs index et leur qualité via Geneious, avant d'être traitées avec le Ribosomal Database Project (RDP) (Col *et al.*, 2008;



Drummond et Vowler, 2012). Les alignements sélectionnés étaient seulement ceux avec un taux de confiance supérieur à 80% (Wang *et al.*, 2007).

Il n'existe couramment pas de standard au niveau de l'analyse du microbiote du lait. Entre les techniques d'extraction et d'amplification qui peuvent sélectionner certains microorganismes au dépend d'autres, et les techniques d'analyses qui peuvent aussi modifier le rendu final, il devient important d'établir des protocoles clairs qui établiront une base dans l'étude du microbiote du lait cru.

### 1.3 Projet de maîtrise

Il existe trois acteurs principaux à ce projet de maîtrise : la mammite bovine, la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*, et le microbiote du lait cru. Tel que décrit au cours de cette introduction, *S. aureus*, agent pathogène majeur de la mammite bovine, est hautement adapté pour l'infection de la glande mammaire ainsi que la persistance dans cet environnement. Comme les antibiothérapies ont des taux variables de réussite et qu'il n'existe pas, à ce jour, de vaccin commercial qui protège adéquatement les vaches des IIM positives pour *S. aureus*, il devient important de trouver d'autres moyens de traiter les mammites bovines. L'accès plus aisé aux plateformes de séquençage a permis, au fil des dernières années, de valoriser l'étude des microbiotes. En voyant que certaines études démontrent comment la pathogénèse de certaines bactéries est amplifiée via la destruction de communautés potentiellement protectrice, nous avons formulé les hypothèses et objectifs de recherche suivants.

- 1- La composition du microbiote du lait sain diffère de la composition des microbiotes de laits où *S. aureus* est hautement prévalent;
- 2- *S. aureus* est influencé (croissance et/ou virulence) de façon différente par les microbiotes de laits sains et de laits mammitiques;
- 3- Le microbiote du lait est lui-même influencé (diversité et proportion des genres bactériens) par la présence de certaines souches de *S. aureus*.

Pour répondre à ces hypothèses, le projet a été divisé en 3 objectifs.

- 1- Caractériser et comparer le microbiote de laits présentant une prévalence de *S. aureus* supérieure à 5 % et des symptômes de mammite (SA+) ainsi que des laits sains avec un CCS inférieure à 150 000 cellules/ml et une prévalence de *S. aureus* inférieure à 5 % (SA-).
- 2- Étudier l'influence des laits sélectionnés dans l'objectif 1 (SA+ et SA-) sur l'expression des gènes de virulence par *Staphylococcus aureus* Newbould.
- 3- Observer l'influence de différentes souches de *Staphylococcus aureus* sur la diversité bactérienne du microbiote du lait

## **CHAPITRE 2**

### **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **2.1 Analyse et comparaison du microbiote du lait cru chez des vaches naturellement infectées à *Staphylococcus aureus***

##### **2.1.1 Échantillonnage**

Le lait a été prélevé sur des vaches préalablement placées en quarantaine pour cause de mammite sur une ferme de la Montérégie avec l'aide du Professeur Simon Dufour (Université de Montréal). Chaque trayon était d'abord désinfecté avec une lingette imbibée d'éthanol. Puis, le premier jet était jeté, le lait récolté et aussitôt placé sur glace. Le trayon était ensuite trempé dans une solution d'iode.

Des petits volumes ont d'abord été analysés en bactériologie de routine pour déterminer s'il y avait des colonies de *S. aureus*. Cette étape consiste en l'étalement de 10 µl de lait sur une gélose au sang. Les géloses sont ensuite incubées pour un minimum de 24 heures à 35°C. Les colonies sont observées pour un phénotype *S. aureus*, puis colorées par coloration de Gram. Si l'observation au microscope révèle un cocci à Gram positif, on peut finaliser la bactériologie avec un test de catalase puis, si celui-ci est positif, un test de coagulase. Le test de catalase consiste en l'étalement d'une petite portion de la colonie sur une lamelle, puis l'ajout de peroxyde 30%. S'il y a production de bulles, la bactérie a l'enzyme catalase. Pour le test de coagulase, on ajoute une bouclée d'une colonie à du plasma de lapin. Si celui-ci coagule, la bactérie a l'enzyme coagulase. Comme *S. aureus* a ces deux enzymes, ces deux tests devaient être positifs pour que la colonie soit considérée comme une colonie de *S. aureus*.

Les quartiers témoins (SA-) ont été échantillonnés et testés trois fois pendant trois semaines. Les laits sélectionnés comme SA – devaient être négatifs à *S. aureus* lors des trois prélèvements et présenter un CCS inférieure à 150 000 cellules/ml. Ces comptes de cellules somatiques étaient obtenus grâce au compteur DeLaval.

Une pré-sélection a été faite, et nous avons récupéré environ deux litres des deux quartiers présélectionnés pour neuf vaches. Ces laits ont été transportés sur glace, séparés en petits aliquots, et congelés dans la même journée. Finalement, deux de ces vaches ont été retirées de l'étude parce que leur quartier SA – contenait des colonies de *S. aureus*. L'étude a été continuée avec les sept vaches restantes. Plus tard, après l'obtention des prévalences bactériennes suite au séquençage, nous avons modifié la définition de SA + et de SA – pour faire ressortir quelques corrélations importantes. Les laits SA – contenaient une abondance moyenne de *S. aureus* entre 0 et 2 %, tandis que les laits SA + en contenaient plus de 5 %.

### **2.1.2 Extraction de l'ADN du lait cru**

Les culots bactériens ont été préparés selon un protocole adapté de Rasolofo *et al.* 2014. Les échantillons étaient décongelés au frigidaire la veille, puis transférés dans des tubes de 15 ml. Pour obtenir une concentration suffisante d'ADN, il est souhaitable d'utiliser 20 ml (donc, 2 tubes de 10 ml). Un volume de 0,2 ml d'EDTA 500 mM/ml pH 8,0 de lait a été ajouté, les tubes ont été mélangés puis incubés à température pièce pendant 5 minutes avant d'être centrifugés à 3000 RPM pendant 45 minutes à 4°C. La crème a été retirée, puis le surnageant a été jeté. Les culots ont été lavés avec 1 ml d'une solution de Tris-HCl 25 mM avec 12% p/v de sucrose pH 8,0, et les doublons (deux tubes de 10 ml du même lait) ont été lavés ensemble puis transférés dans un tube de 1,5 ml stérile. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12 000 x g pendant 10 minutes, et le surnageant a été jeté.

L'extraction de l'ADN a été faite selon les recommandations de la trousse PowerFood de Qiagen, mais avec quelques modifications. Lors de la première incubation lytique, 45 mg/ml de lysozyme, 50 U/ml de mutanolysine et 0,036 mg/ml de lysostaphine ont été ajoutés. Tous les volumes de lavages supérieurs à 500 µl ont été réduits à 500 µl. De plus, l'élution finale a été faite avec 30 µl d'eau stérile. Finalement, chaque condition (SA+ et SA -) a été extraite en duplicata et seulement l'ADN avec une concentration supérieure à 5 ng/µl passait aux étapes suivantes.

### 2.1.3 qPCR avec les amorces sélectionnant la région V1-V2 de l'ADN de l'ARN 16S

Tous les échantillons ont été dilués à 5 ng/μl avant l'amplification. Les régions V1-V2 de l'ADN de l'ARN 16S ont été amplifiées par qPCR avec les amorces inspirés d'Oikonomou *et al.*, 2014 en utilisant un protocole fourni pour le laboratoire de Sébastien Rodrigue:

16S-TruSeq-A Forward : ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-NNNNN-  
TCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

16S-TruSeq-B Reverse : GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT-NNNNN-  
CATGCTGCCTCCCGTAGGAGT

Pour l'amorce *forward*, il s'agit du primer 27F en italique, et de 338R pour le *reverse*. Les deux nucléotides soulignés sont ajoutés pour faciliter l'amplification. Les autres lettres sont des adaptateurs Illumina.

L'enzyme « VeraSeq 2.0 High Fidelity Polymerase » de Enzymatics a été utilisée comme polymérase et le EvaGreen Dye de Biotium comme colorant. L'ADN était amplifié dans un thermocycleur à qPCR où la réaction était arrêtée avant que les courbes d'amplification atteignent un plateau. La dénaturation initiale était à 94°C pendant 3 minutes, puis diminuait à 30 secondes pour les cycles suivant. L'hybridation était à 60°C pendant 10 secondes, puis l'élongation se faisait à 72°C pendant 20 secondes. Une élongation finale d'une minute a été

ajoutée juste avant d'atteindre le plateau, ce qui se faisait généralement autour de 20 à 25 cycles.

Après l'amplification, les produits étaient vérifiés sur gel d'agarose 1 % et purifiés avec la technique SPRI (solide phase reversible immobilization). Les produits étaient amplifiés de nouveau avec des index de séquençage et le même programme PCR, puis purifiés une seconde fois par SPRI. Les produits étaient ensuite dosés par méthode PicoGreen, avant d'être mis dans le même tube de façon équimolaire, puis envoyé à la plateforme RNomics de l'Université de Sherbrooke pour être séquençé par Illumina MiSeq.



#### **2.1.4 Séquençage et analyse des données**

Les échantillons ont été séquencés par Illumina MiSeq à la plateforme RNomics de l'Université de Sherbrooke. Les séquences ont ensuite été traitées via le pipeline QIIME2, et les OTU ont été alignées sur la base de données SILVA. Pour le calcul des index de Shannon et de Chao1, les séquences ont été raréfiées à 22 000.

## **2.2 Modifications du transcriptome chez *Staphylococcus aureus* Newbould en croissance dans différents laits**

### **2.2.1 Protocole de coculture**

*S. aureus* Newbould (SANB) a d'abord été décongelé sur gélose TS et incubé à 35°C pendant 24 heures. La veille de la coculture, une partie d'une colonie de *S. aureus* Newbould a été repiquée dans du bouillon TS et incubé à 35°C avec une rotation de 250 rpm pendant toute la nuit. Le lendemain matin, 500 µl de cette culture a été transféré dans 4,5 ml de bouillon TS frais et remis à incuber dans les mêmes conditions pendant 2 heures. Une heure avant le début de l'expérience, le lait à tester a été mis dans les mêmes conditions d'incubation, ainsi qu'un surplus de bouillon TSB. Cette étape avait pour but que tous les milieux soient à la même température au début de la coculture.

Au moment de la coculture, la culture de *S. aureus* a été diluée dans le bouillon TS préchauffé pour obtenir une concentration de départ autour de  $10^3$  CFU/ml. Les plaques de cultures Transwell (6 puits) ont ensuite été préparées en mettant 2,6 ml du lait à tester dans les puits, et 1,6 ml de la culture TSB de *S. aureus* dilué dans l'insert. L'insert utilisé avait une membrane avec des pores de 0,2 microns. Pour le témoin, 2,6 ml de bouillon TS remplaçait le lait. Les plaques ont été incubées de façon stationnaire à 35°C pendant six heures. À plusieurs temps, dont le temps zéro, 20 µl de l'insert a été prélevé pour analyser la croissance de *S. aureus*. De plus, pour s'assurer qu'il n'y avait pas de transfert de bactéries du lait à l'insert, les tests de croissance ont aussi été fait sur des géloses sel-mannitol, dont la couleur devient jaune en présence de *S. aureus*.

Après 6 heures d'incubation, la portion de l'insert a été récupérée et incubée à température pièce pendant 5 minutes avec 2 ml de RNA protect par ml de culture. Les échantillons ont ensuite subi une centrifugation de 30 minutes à température pièce avec 3 500 rpm. Le surnageant a été jeté et les culots ont été congelés à -80°C.

Chaque condition a été faite en triplicata.

### **2.2.2 Extraction de l'ARN**

L'extraction de l'ARN a été faite selon les recommandations de la trousse E.Z.N.A. Total RNA Kit, avec quelques modifications. Les culots ont d'abord été lavés et dissouts avec 500 µl de Tris-EDTA (TE) 1X pH 8,0 et centrifugé à 13 400 rpm pendant 2 minutes, avant de retirer tout le surnageant. Pour améliorer la lyse cellulaire, les culots ont ensuite été chauffés et refroidis pendant 5 cycles en trempant 10 secondes dans de l'eau à 60°C puis mis dans la glace sèche. De plus, pour s'assurer d'une excellente lyse cellulaire, les échantillons ont aussi été incubés à 37°C pendant une heure avec 200 µl de lysostaphine (200 µg/ml), 20 µl de protéinase K (20 mg/ml) et 5 µl de lysozyme (50 mg/ml). Le reste du protocole était fait selon le protocole fourni, à l'exception de l'élution finale qui a plutôt été fait avec 30 µl d'eau stérile.

L'analyse de la qualité de l'ARN a été faite selon le protocole fourni par Agilent RNA Nano 6000, et la lecture a été faite avec l'Agilent 2100 Bioanalyzer.

### 2.2.3 Séquençage et analyse de données

Les échantillons ont été séquencés par Illumina MiSeq à la plateforme de l'Université de Sherbrooke. Les séquences obtenues ont ensuite été traitées et analysées par Jean-François Lucier, bioinformaticien de la faculté, selon le programme DeSeq pour l'analyse du séquençage d'ARN. Brièvement, la qualité des séquences a été établie par FastQC avant de couper les lectures de basses qualités. L'alignement a été fait avec BowTie sur le génome de *S. aureus* RF122, une souche dont les gènes du génome cœur sont 70 % homologues à ceux de *S. aureus* Newbould (Peton et al., 2014). La qualité de l'alignement a ensuite été analysée, puis le RPKM (reads per kilobase per million reads mapped) et le FPKM ont été calculé (fragments per kilobase per million mapped reads). Les statistiques ont ensuite été faites pour établir s'il y avait une différence significative dans le nombre de transcrits des gènes d'une condition à l'autre. Lors de l'analyse post-traitement, seuls les gènes montrant un  $p$  plus petit que 0,05 ont été observés. Les gènes dits « hypothétiques » dont l'identité n'était pas connue dans RF122 ont été mis sur Blast et comparés les séquences de *S. aureus* Newbould pour en déterminer l'identité.

## **2.3 Effets de différentes souches de *Staphylococcus aureus* sur le microbiote d'un lait considéré comme sain**

### **2.3.1 Protocole de coculture**

Les souches de *S. aureus* à tester ont d'abord été décongelées sur gélose TS et incubées à 35°C pendant 24 heures. La veille de la coculture, les souches ont été repiquées dans du bouillon TS et incubés à 35°C avec une rotation de 250 rpm pendant toute la nuit. Le lendemain matin, 500 µl de ces cultures ont été transférées dans 4,5 ml de bouillon TS frais et remis à incuber dans les mêmes conditions pendant 2 heures. Une heure avant le début de l'expérience, le lait sélectionné a été mis dans les mêmes conditions d'incubation. Cette étape avait pour but que tous les milieux soient à la même température au début de la coculture.

Une fois l'incubation primaire finalisée, les laits ont été inoculés avec 10<sup>3</sup> CFU/ml de la souche de *S. aureus* sélectionnée, sauf un duplicata de témoins, puis incubés à 35°C pendant 6 heures au total. Les laits ont été échantillonnés à plusieurs temps. Ces échantillons ont été dilués dans du PBS 1X, puis 10 µl ont été mis sur des géloses TS et sel-mannitol pour analyser la croissance de *S. aureus*.

### **2.3.2 Traitement au propidium monoazide**

Les culots bactériens ont été préparés selon un protocole adapté de Rasolofo *et al.* 2014. Un volume de 0,2 ml d'EDTA 500 mM/ml de lait a été ajouté, les tubes ont été mélangés puis incubés à température pièce pendant 5 minutes avant d'être centrifugés à 3000 RPM pendant 45 minutes à 4°C. La crème a été retirée, puis le surnageant a été jeté. Les culots ont été lavés avec 1 ml d'une solution de Tris-HCl 25 mM avec 12% p/v de sucrose puis transféré dans un tube de 1,5 ml stérile. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12 000 x g pendant 10 minutes, et le surnageant a été jeté.

Le culot a été lavé avec 800 µl de TE 1X stérile et, dans la noirceur, 1,5 µl de propidium monoazide (PMA) (Biotium) y a été ajouté. Les tubes ont ensuite été agités à la noirceur pendant 5 minutes avant d'être mis sur glace à 20 cm d'une lampe halogène de 500 W. Puis, les tubes ont été centrifugés à 12 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été jeté puis les culots ont été congelés à -80°C jusqu'à l'extraction.

### **2.3.3 Extraction de l'ADN du lait cru**

L'extraction de l'ADN a été faite selon les recommandations de la trousse PowerFood de Qiagen, et avec les mêmes modifications inscrites sur le protocole décrit en section 2.1.2. Chaque coculture a été faite en duplicata.



#### **2.3.4 qPCR avec les amorces sélectionnant la région V1-V2 de l'ADN de l'ARN 16S**

Le protocole décrit en section 2.1.3 a été utilisé pour la préparation de la librairie de séquençage.

### **2.3.5 Séquençage et analyse des données**

Les échantillons ont été séquencés par Illumina MiSeq à la plateforme RNomics de l'Université de Sherbrooke. Les séquences ont ensuite été traitées via le pipeline QIIME2, et les unités opérationnelles de taxonomie (OTU) ont été alignées sur la base de données SILVA. Pour le calcul des index de Shannon et de Chao1, les séquences ont été raréfiées à 53 000 séquences.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### **3.1 Analyse et comparaison du microbiote du lait cru chez des vaches naturellement infectées à *Staphylococcus aureus***

##### **3.1.1 Description de l'échantillon**

Les vaches ont été sélectionnées dans une ferme commerciale en Montérégie. Une liste des animaux atteints d'une mammite avait d'abord été obtenue, avec les résultats de bactériologies antérieures. Les vaches échantillonnées étaient donc en quarantaine et atteintes de mammites, souvent causées par *S. aureus*. Lors de la première visite, le lait de 13 vaches a été échantillonné. Le lait de chaque quartier a été collecté séparément, nous cherchions des vaches ayant à la fois un quartier infecté et un quartier non-infecté par *S. aureus*.

Sur les 52 quartiers, 5 étaient positifs en bactériologie pour la présence de *S. aureus*, et provenaient de 5 vaches différentes. Lors de visites subséquentes, 4 autres vaches ont été sélectionnées.

Le lait a donc été récupéré, avant la fin des 3 semaines nécessaires pour confirmer qu'un quartier était réellement négatif pour la présence de *S. aureus*. Deux vaches ont donc été éliminées plus tard, lorsque leurs tests en bactériologie ont confirmé la présence de *S. aureus* dans leurs quartiers supposément négatifs pour *S. aureus*. L'étude comptait donc 7 vaches. Les CCS déterminés avec le compteur DeLaval sont présentés dans le Tableau 1.

**Tableau 1 : CCS des vaches sélectionnées pour l'étude.**

Vache	CCS total (1000 cellules/ml) des 4 quartiers	CCS (1000 cellules/ml) du quartier négatif en bactériologie
1	65	22
2	204	142
3	141	22
4	116	54
6	5177	66
8	13	20
9	ND	6

**ND : valeur non-disponible**

### 3.1.2 Concentration d'ADN obtenu

Les concentrations d'ADN obtenues à cette étape sont présentées dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Concentration de l'ADN obtenu après l'extraction avec la trousse PowerFood de Qiagen.**

Vache	Quartier	Réplicat	
		A (ng/μl)	B (ng/μl)
1	SA +	8,3	11,7
1	SA –	14,4	6,5
2	SA +	9,0	10,4
2	SA –	18,3	12,0
3	SA +	5,8	9,8
3	SA –	5,7	8,1
4	SA +	11,5	6,2
4	SA –	8,4	13,6
6	SA +	37,1	28,2
6	SA –	20,7	7,8
8	SA +	20,5	5,3
8	SA –	6,5	10,5
9	SA +	20,6	71,4
9	SA –	7,0	6,7

### **3.1.3 Résultats des qPCR**

Les concentrations d'ADN obtenues suite aux amplifications par PCR sont démontrées dans le Tableau 3.

**Tableau 3 : Concentration d'ADN obtenu après le premier et le deuxième cycle d'amplification et de purification par SPRI.**

Vache	Quartier	Réplicat	Concentration (ng/μl) après SPRI #1	Concentration (ng/μl) après SPRI #2 *
1	SA +	A	2,4	3,4
1	SA +	B	6,5	2,8
1	SA -	A	1,4	5,5
1	SA -	B	1,8	5,3
2	SA +	A	2,4	4,6
2	SA +	B	1,1	3,7
2	SA -	A	1,9	4,7
2	SA -	B	2,9	2,9
3	SA +	A	5,6	3,2
3	SA +	B	3,1	4,5
3	SA -	A	2,6	3,4
3	SA -	B	2,6	4,0
4	SA +	A	3,5	5,5
4	SA +	B	2,7	4,6
4	SA -	A	1,7	5,1
4	SA -	B	1,2	3,7
6	SA +	A	2,1	3,2
6	SA +	B	2,4	2,8
6	SA -	A	2,3	3,2
6	SA -	B	3,0	3,4
8	SA +	A	3,1	3,9
8	SA +	B	2,2	3,5
8	SA -	A	1,7	4,8
8	SA -	B	5,4	2,9
9	SA +	A	1,5	5,6
9	SA +	B	3,2	4,0
9	SA -	A	1,4	4,8
9	SA -	B	3,6	4,6

\*Obtenu par la technique de dosage PicoGreen avant l'envoi au séquençage.

### 3.1.4 Généralités du séquençage

Les vaches 1, 8 et 9 ont été retirées de l'analyse du séquençage. La vache 1 présentait une prévalence de *S. aureus* autour de 99 %, ce qui était possiblement causé par une contamination. Les échantillons des vaches 8 et 9 ne montraient pas suffisamment de séquence, la couverture n'était donc pas idéale.

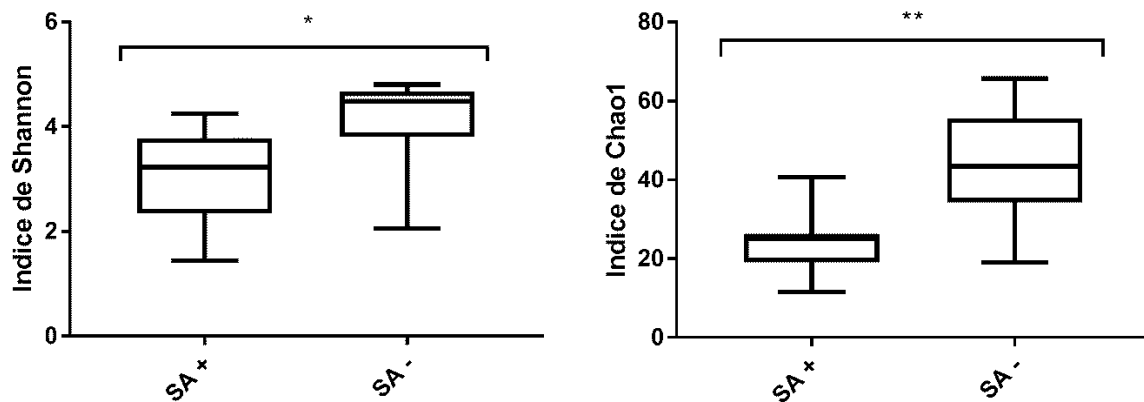
Sur les 45 460 séquences liées à une identité bactérienne, quatre phylums, comprenant 43 genres et 80 espèces bactériennes, ont été identifiés. La couverture moyenne était d'environ 2841 séquences par échantillons.

Lors de l'analyse, nous avons revu nos critères de sélection des quartiers SA+ et SA -. Nous avons choisi de nous fier plutôt à la prévalence de *S. aureus* qu'à sa présence en bactériologie ou aux symptômes du quartier prélevé. Le terme SA + caractérise donc les échantillons présentant une prévalence de *S. aureus* égale ou supérieure à 5 %, tandis que le terme SA – caractérise un échantillon ayant une prévalence de *S. aureus* inférieure à 2 %.



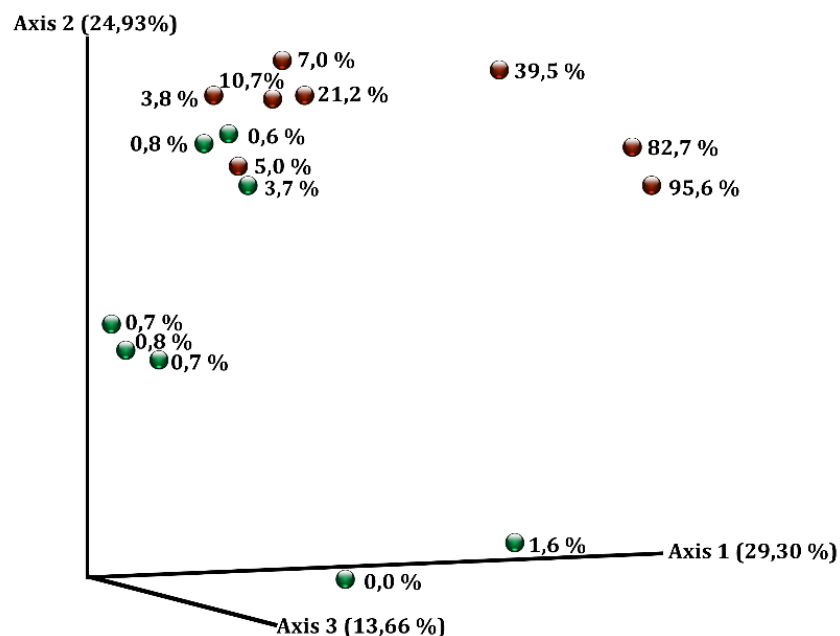
### 3.1.5 Diversité et richesse des échantillons

L'indice de diversité de Shannon et l'indice de richesse de Chao1 sont tous les deux significativement plus bas dans l'ensemble de tous les quartiers SA + (Figure 4). Cet écart est majeur chez la vache 6, avec un  $p$  de 0,002 pour l'index de Shannon et de 0,012 pour l'index de Chao1. La vache 6 est aussi la vache présentant le CCS total le plus élevé : un peu plus de 5 millions comparé à la moyenne de 154 000 cellules/ml pour les 3 autres vaches.



**Figure 4:** Index de diversité de Shannon et index de richesse de Chao1 calculés avec le pipeline QIIME2 selon la prévalence de *S. aureus* dans les échantillons. SA + : 5 à 95 % de prévalence; SA - : < 2 % de prévalence. Les astérisques représentent un  $p$  de 0,04 pour l'index de Shannon et de 0,009 pour l'index de Chao1, tel que calculé avec le test t de Welch dans GraphPad Prism 7,02.

De plus, tel que démontré sur ce graphique de PCoA (principal coordinate analysis) de dissimilarité Bray-Curtis (Figure 5), les échantillons SA + et SA – sont plutôt séparés. En ajoutant la prévalence de *S. aureus*, on voit un gradient d'éloignement en fonction de la proportion de *S. aureus* dans les échantillons. Ceci peut indiquer que les modifications au niveau microbiote sont liées à l'augmentation de la prévalence de *S. aureus*.

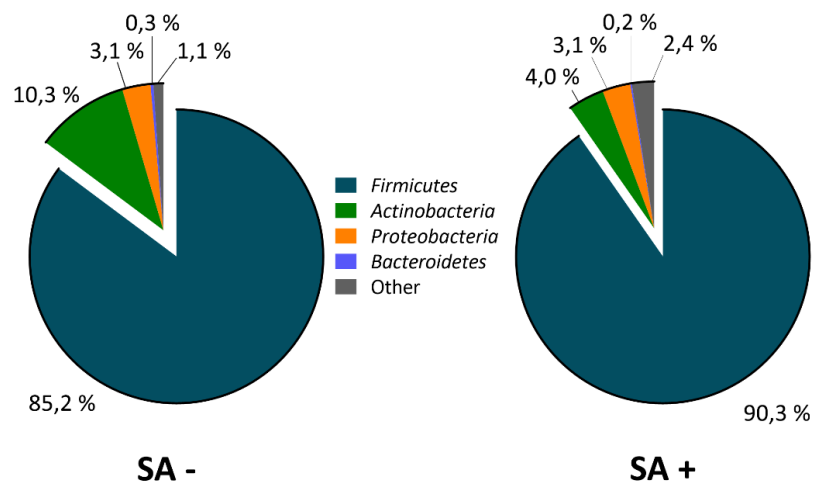


**Figure 5: Graphique de dissimilarité de Bray-Curtis calculé avec QIIME2.**

Les ronds rouges représentent les échantillons SA + tandis que les ronds verts représentent les échantillons SA – (SA + : 5 à 95 %; SA - : < 2 %). La prévalence de *S. aureus* propre à l'échantillon est indiquée en pourcentage à côté de chaque coordonné.

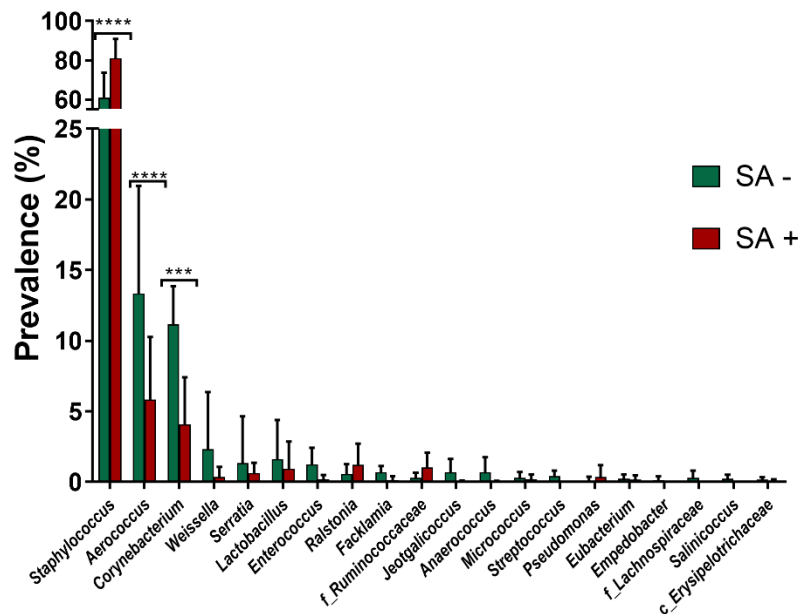
### 3.1.6 Analyse des prévalences bactériennes

Les 4 phylums retrouvés sont les *Firmicutes*, les *Actinobacteriae*, les *Proteobacteriae* et les *Bacteroidetes*. Dans les deux conditions, les *Firmicutes* formaient le phylum majoritaire et leur pourcentage de prévalence était plus élevé que tous les autres phylums additionnés. La figure 6 illustre les différences notées au niveau de la prévalence des phylums dans chacune des conditions. Seulement les *Firmicutes* et les *Actinobactéries* étaient significativement différents, les *Firmicutes* étant significativement plus prévalent et les *Actinobactéries* significativement moins prévalent dans les quartiers SA +. Il n'y a pas de changement au niveau de la prévalence des *Protéobactéries* et des *Bactéroidetes*. Au niveau des autres séquences retrouvées, il s'agissait surtout d'ADN de mouflon (*Ovis canadensis*) ainsi que de l'ADN de chloroplastes de plants de tabac (*Nicotiana tabacum*) et du pin blanc (*Picea glauca*).



**Figure 6:** Prévalence (%) des phylums retrouvés dans les échantillons triés selon la prévalence de *S. aureus* (quartiers SA + : 5 à 95 %; quartiers SA - : < 2 %).

Au niveau des genres retrouvés, 28 sont communs aux deux conditions (quartiers SA+ et SA-), tandis que 2 se retrouvent seulement dans les échantillons SA + et 13 sont uniquement observés dans les échantillons SA -. De ces genres, les plus affectés sont *Staphylococcus*, *Aerococcus* et *Corynebacterium*, comme démontré dans la figure 7. *Staphylococcus* augmente de  $60,8 \pm 13,0$  % à  $81,0 \pm 9,8$  %, tandis qu'*Aerococcus* et *Corynebacterium* diminuent respectivement de  $13,3 \pm 7,6$  % à  $5,8 \pm 4,4$  % et de  $11,2 \pm 2,7$  % à  $4,0 \pm 3,4$  %.



**Figure 7 : Prévalence (%) des 20 genres les plus abondants dans les échantillons SA + et SA -.**

Analyse « two-way ANOVA » des moyennes de tous les échantillons selon leur prévalence en *S. aureus* fait avec GraphPad Prism 7,02 (SA + : 5 à 95 %; SA - : < 2 %). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p = 0,0003$ .

Lorsqu'on regarde individuellement, d'autres prévalences de genre sont aussi modifiées par la condition de l'échantillon, comme *Weissella* et *Serratia* qui sont significativement moins abondants dans le lait SA + de la vache 2 (Tableau 4).

**Tableau 4 : Les 5 genres dont la prévalence est significativement différente chez le lait SA + en comparaison avec le lait SA –.**

	Vache 2	Vache 3	Vache 4	Vache 6
<i>Staphylococcus</i>	↗ ****	↗ ****	NS	↗ ****
<i>Aerococcus</i>	↘ ***	NS	NS	↘ ****
<i>Corynebacterium</i>	↘ ****	↘ **	NS	↘ ***
<i>Weissella</i>	↘ ****	NS	NS	NS
<i>Serratia</i>	↘ **	NS	NS	NS

↗ : augmentation de la prévalence dans le lait SA +; ↘ diminution de la prévalence dans le lait SA +; NS : non-significatif; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p = 0,0004$ ; \*\*  $p = 0,0016$ .

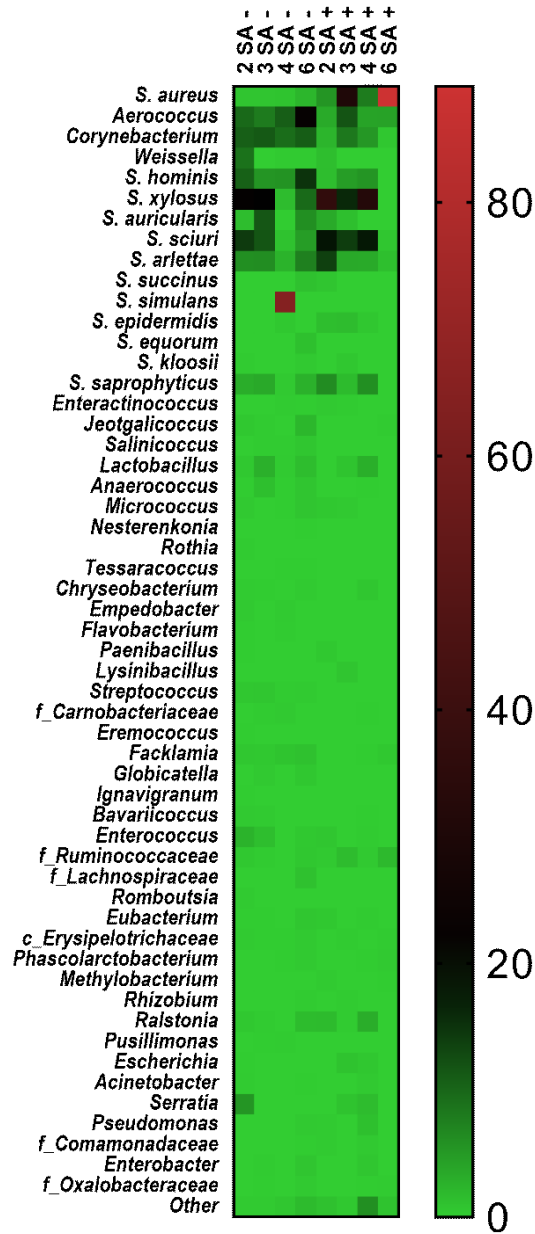
En analysant les espèces associées aux genres les plus affectés, tel que démontré dans le tableau 5, plusieurs réagissent différemment à l'intérieur du même genre. L'effet de l'augmentation de la prévalence de *S. aureus* se remarque plus particulièrement au niveau d'*A. viridans*, de *Corynebacterium* sp. et de *W. paramesenteroides*. La prévalence de *C. casei* diminue aussi dans tous les échantillons SA +, même si ce n'est pas de façon significative.

**Tableau 5 : Les espèces bactériennes des 5 genres dont la prévalence est significativement différente dans le lait SA + en comparaison avec le lait SA –.**

	Vache 2	Vache 3	Vache 4	Vache 6
<i>Staphylococcus aureus</i>	↗	↗****	↗	↗****
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	↗	↗	↗	ND
<i>Serratia sp.</i>	ND	↗	↗	ND
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	ND	↗	↗	ND
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	ND	ND	↗	ND
<i>Staphylococcus sciuri</i>	↗	↗	↗	↘
<i>Corynebacterium xerosis</i>	ND	↗	↘	ND
<i>Staphylococcus succinus</i>	↗	ND	ND	↘
<i>Staphylococcus arlettae</i>	↗****	↘	↗	↘
<i>Staphylococcus kloosii</i>	↘	↗	ND	↘
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	↗	↘	↗	↘
<i>Staphylococcus xylosus</i>	↗****	↘	↗***	↘***
<i>Staphylococcus auricularis</i>	↗	↘**	ND	ND
<i>Serratia marcescens</i>	↘*	↗	↗	
<i>Aerococcus viridans</i>	↘**	↗	ND	↘****
<i>Staphylococcus hominis</i>	↘****	↘	↘	↘
<i>Corynebacterium sp.</i>	↘**	↘	↘	↘
<i>Weissella paramesenteroides</i>	↘*	ND	↘	↘
<i>Corynebacterium casei</i>	↘	↘	↘	↘
<i>Aerococcus vaginalis</i>	↘	↘	ND	↘
<i>Corynebacterium caporealis</i>	↘	ND	↘	↘
<i>Corynebacterium flavescens</i>	↘	ND	↘	ND
<i>Aerococcus suis</i>	↘	ND	ND	↘
<i>Staphylococcus equorum</i>	ND	ND		↘
<i>Corynebacterium lactis</i>	ND	ND	↘	ND
<i>Corynebacterium stationis</i>	↘	ND	ND	ND
<i>Weissella sp.</i>	↘	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus simulans</i>	ND	ND	↘****	ND

↗ : augmentation de la prévalence dans le lait SA +; ↘ diminution de la prévalence dans le lait SA +; ND : non-disponible (aucune séquence alignée); \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p = 0,0004$ ; \*\*  $p = 0,0016$ ; \*  $p < 0,0015$ .

Ces variations subtiles s’observent aussi dans ce « heatmap » de tous les genres retrouvés dans les échantillons (Figure 8).

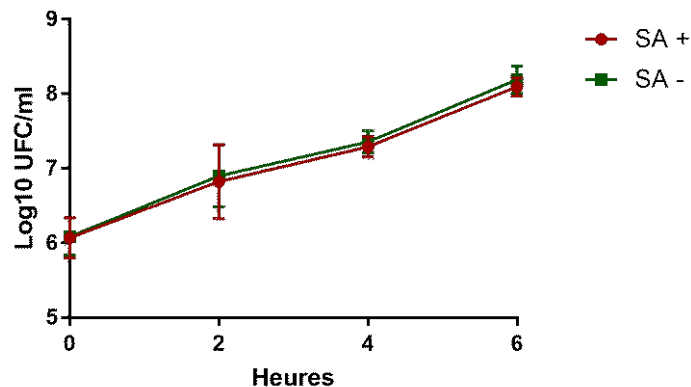


**Figure 8 :** « Heatmap » de tous les genres retrouvés ainsi que des espèces de *Staphylococcus* sp., colorés en fonction de leur prévalence (barre de droite en %).

### 3.2 Modifications du transcriptome chez *Staphylococcus aureus* Newbould en croissance dans différents laits

#### 3.2.1 Courbes de croissance

Les courbes de croissance de SANB en culture dans du lait provenant soit de quartiers SA + ou SA – ne montrent aucune différence entre elles (Figure 9).



**Figure 9 :** Log<sub>10</sub> du nombre d'UFC de *S. aureus* Newbould comptés sur gélose mannitol-sel en fonction du temps de culture dans le lait de toutes les vaches.



### **3.2.2 Concentration et qualité de l'ARN extrait**

Les concentrations d'ARN de SANB extrait suite aux 6 heures de culture dans le lait des quartiers SA<sup>+</sup> et SA<sup>-</sup> des différentes vaches sont assez importantes, tel que démontré dans le Tableau 6.

**Tableau 6 : Concentration d'ARN obtenu à partir de l'insert contenant la culture de *S. aureus* Newbould en contact avec le lait des différentes vaches en fonction de la prévalence de *S. aureus* (SA + : 5 à 95 %; SA - : < 2 %)**

Vache	Quartier	Triplicata	ng/μl
2	SA +	1	49,7
2	SA +	2	643,4
2	SA +	3	870,3
2	SA -	1	88,0
2	SA -	2	628,8
2	SA -	3	1179,4
3	SA +	1	171,1
3	SA +	2	1015,0
3	SA +	3	1228,3
3	SA -	1	119,1
3	SA -	2	705,9
3	SA -	3	553,8
4	SA +	1	225,5
4	SA +	2	642,3
4	SA +	3	861,1
4	SA -	1	157,3
4	SA -	2	1119,2
4	SA -	3	1106,2
6	SA +	1	67,2
6	SA +	2	430,8
6	SA +	3	582,9
6	SA -	1	44,7
6	SA -	2	813,1
6	SA -	3	881,3
Témoin	Témoin	1	7,1
Témoin	Témoin	1	13,0
Témoin	Témoin	2	23,9
Témoin	Témoin	2	158,5
Témoin	Témoin	3	702,3
Témoin	Témoin	3	9,0

De plus, l'ARN extrait était de bonne qualité, tel qu'observé après analyse sur le BioAnalyzer Agilent. L'intégrité, calculée grâce au RIN (RNA integrity number), était en moyenne de  $8,9 \pm 0,4$  pour les 12 échantillons testés. Plus le chiffre se rapproche de 10, moins l'ARN est dégradé.

### **3.2.3 Généralités du séquençage**

Le séquençage a donné environ 536 millions de séquence avec un score de qualité moyen de 34,5. Il y a donc, en moyenne, 9 millions de séquences par échantillons (Tableau 7). Au total, 440 gènes sont exprimés de façon significativement différente lorsqu'on prend en compte toutes les comparaisons possibles.

**Tableau 7 : Nombre de séquences obtenu suite au séquençage de l'ARN extrait de *S. aureus* Newbould en croissance en contact avec le lait des différentes vaches en fonction de la prévalence de *S. aureus* (SA + : 5 à 95 %; SA - : < 2 %).**

Vache	Quartier	Triplicata	Nombre de séquences
2	SA +	1	7 761 020
2	SA +	2	13 000 286
2	SA +	3	10 603 971
2	SA -	1	5 387 046
2	SA -	2	6 171 502
2	SA -	3	3 782 050
3	SA +	1	8 753 748
3	SA +	2	12 722 393
3	SA +	3	8 372 361
3	SA -	1	9 633 312
3	SA -	2	8 383 985
3	SA -	3	9 151 334
4	SA +	1	10 520 662
4	SA +	2	9 919 002
4	SA +	3	10 607 823
4	SA -	1	12 618 801
4	SA -	2	9 566 668
4	SA -	3	12 262 039
6	SA +	1	11 846 965
6	SA +	2	9 424 673
6	SA +	3	17 882 352
6	SA -	1	8 339 365
6	SA -	2	13 053 182
6	SA -	3	9 520 880
Témoin	Témoin	1	8 052 131
Témoin	Témoin	1	5 609 990
Témoin	Témoin	2	4 485 147
Témoin	Témoin	2	5 953 043
Témoin	Témoin	3	15 000 961
Témoin	Témoin	3	7 050 041

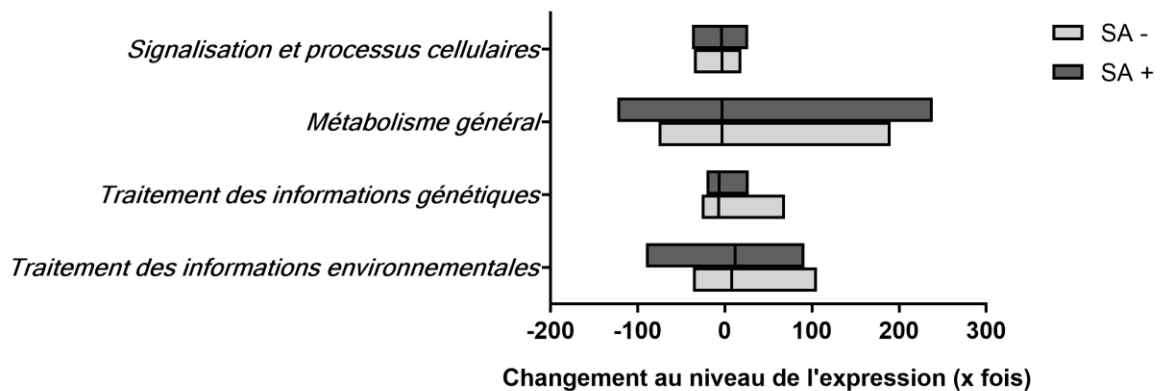
### **3.2.4 Modifications au niveau du transcriptome de *S. aureus* Newbould**

L'identité des voies métaboliques liée aux gènes exprimés de façon significativement différentielle a pu être déterminée grâce à la plateforme de « KEGG orthology » pour la majorité des séquences. Environ 19 % des protéines n'étaient pas encore identifiées au moment de l'alignement, puis demeuraient hypothétique lors du second alignement sur la plateforme BLAST. Pour le reste des gènes identifiés, quatre branches métaboliques ont été retenues : signalisation et processus cellulaires, métabolisme général, traitement des informations génétiques et traitements des informations environnementales. Ensuite, des sous-catégories ont été déterminées pour chacune des branches.

La catégorie « signalisation et processus cellulaire » prend donc en compte des protéines de signalisation et de transport générale, des protéines de système à deux composantes, des toxines, des protéines liées à la pathogénicité, ainsi que des molécules de quorum sensing. Environ 40 % des gènes exprimés de façon différentielle font partie de la branche du « métabolisme général » avec des catégories comprenant le métabolisme des lipides, des glucides, des acides aminés, des nucléotides, des vitamines et des cofacteurs, ainsi que le métabolisme de l'azote, du méthane et du soufre, et finalement des protéines au carrefour de plusieurs voies métaboliques. La branche métabolique de « traitement des informations génétiques » comprend tout ce qui attrait à la division cellulaire, les protéines chaperonnes ou de réaction aux stress, les facteurs de transcription, la traduction et la transcription, ainsi qu'à la synthèse d'ARNt et de ribosomes. Finalement, la voie de « traitement des informations environnementales » attrait à toute signalisation au niveau de la membrane ainsi qu'au transport membranaire, dont les transporteurs ABC et la transduction de signaux.

### 3.2.5 Différences au niveau du transcriptome : comparaison lait-bouillon TS

Seuls les gènes de la branche « traitement des informations environnementales » sont en moyenne plus exprimés par SANB dans les laits (SA + ou SA –) que dans le bouillon TS (Figure 10).



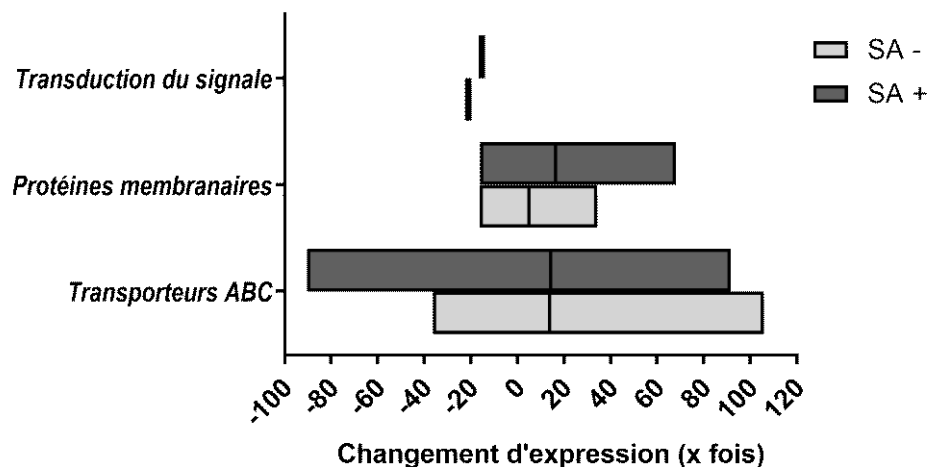
**Figure 10 : Changement au niveau de l'expression des gènes des différentes voies métaboliques.**

Les données sont représentées par des boîtes de données minimales et maximales, ainsi qu'une ligne de moyenne. L'augmentation ou la diminution de l'expression est déterminée par la division du taux d'expression dans les laits SA + ou SA – par le taux d'expression des gènes dans le bouillon TS.

Cette augmentation dans le nombre de transcrits de la voie « traitement des informations environnementales » chez SANB lors d'une croissance en contact avec les laits SA + et SA – est surtout au niveau de l'expression de gènes liés à des transporteurs ABC ainsi qu'à des

protéines membranaires (Figure 11). La protéine EssB liée au système de sécrétion de type VII (T7SS) est 34 et 68 fois plus exprimée lors de la croissance dans du lait SA – et SA +, respectivement, que lors de la croissance dans le bouillon TS. Dans les transporteurs ABC, même s’il y a une diminution de l’expression de protéines liées aux transporteurs d’hémine et de cystéine, des gènes liés à des composantes d’autres transporteurs sont plus exprimés par SANB dans le lait. Par exemple, plusieurs sous-unités de transporteurs de peptides et de biotine sont plus exprimées, ainsi que *sstB*, lié à un transporteur de la famille FecCD (une famille de ferrichrome), qui est 34 fois plus exprimé lors de la croissance dans du lait SA +. L’un des gènes était 1,5 millions de fois plus exprimé en croissance dans le lait SA –, et a donc été retiré du graphique de la Figure 11 par son écart au reste des données. Il s’agit d’un gène qui code pour la sous-unité PstC de la perméase d’un transporteur de phosphate.



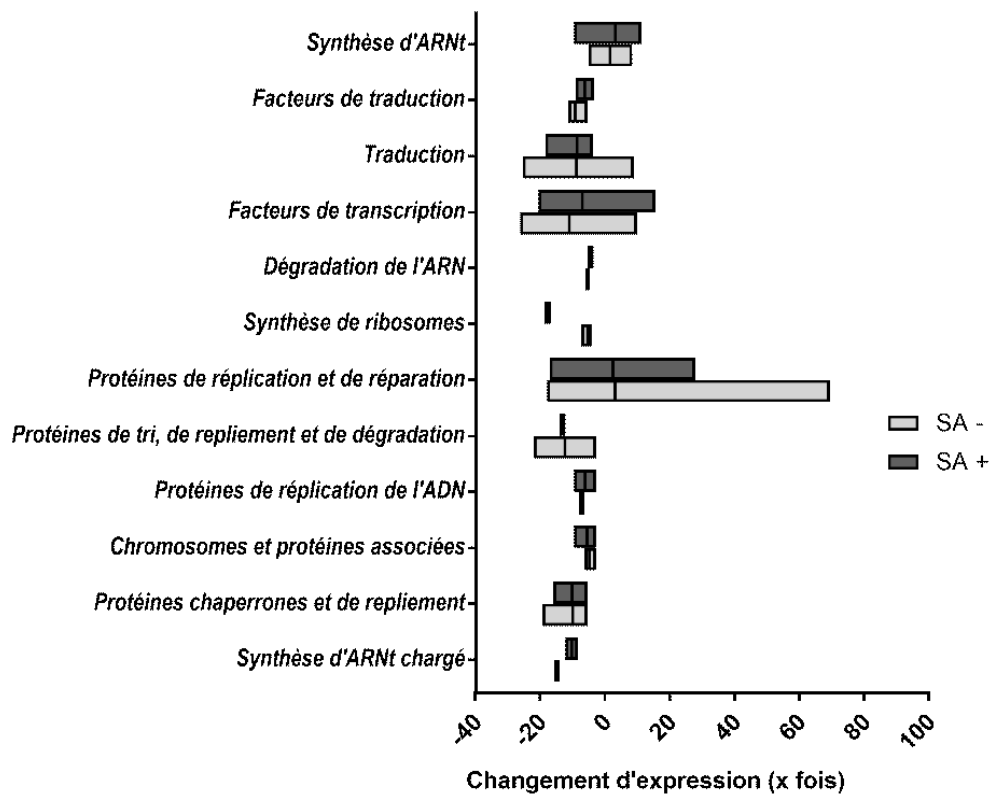


**Figure 11 : Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie des traitements des informations environnementales.**

Les données sont représentées par des boîtes de données minimales et maximales, ainsi qu'une ligne de moyenne. L'augmentation ou la diminution de l'expression est déterminée par la division du taux d'expression dans les laits SA + ou SA - par le taux d'expression des gènes dans le bouillon TS.

En regardant au niveau des autres branches métaboliques, qui sont en moyenne moins exprimées par SANB dans le lait SA + ou SA - que lors de la croissance dans le bouillon TS, certains motifs d'expression ressortent. Au niveau de la voie du « traitement des informations génétiques », les gènes liés aux réactions aux stress, comme ceux codant pour des protéines chaperonnes (*dnaJ*, *dnaK*, *grpE*, *groEL* et *groES*), sont toujours moins exprimés dans les laits SA + et SA - que dans le bouillon TS (Figure 12). L'expression de gènes liés à la division cellulaire, comme *ftsZ*, *ftsA* et *ftsH*, est aussi diminuée de façon générale dans les deux types de lait, tout comme les ribonucléases Y et J, lié à la dégradation de l'ARN. Quelques gènes liés à des répresseurs étaient aussi moins exprimés, comme *codY*, qui code pour un répresseur

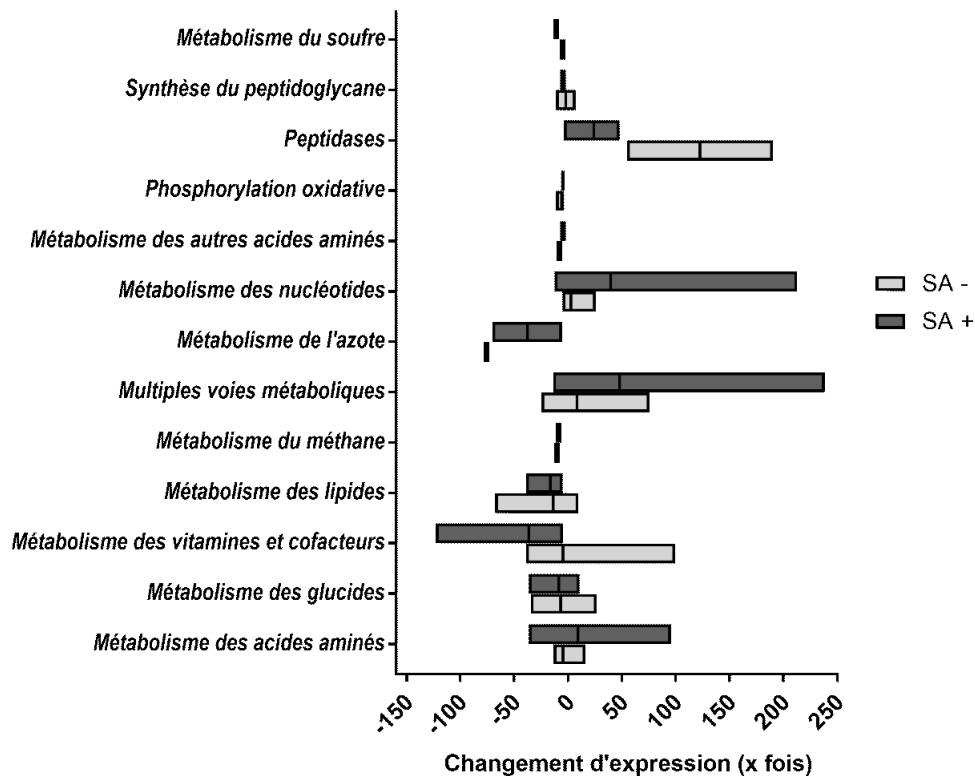
de transcription visant les gènes de virulence. Au niveau de la traduction, les gènes codant pour 17 protéines des sous-unités ribosomales 50S et 30S étaient moins exprimés en croissance dans du lait.



**Figure 12 : Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie des traitements des informations génétiques.**

Les données sont représentées par des boîtes de données minimales et maximales, ainsi qu'une ligne de moyenne. L'augmentation ou la diminution de l'expression est déterminée par la division du taux d'expression dans les laits SA + ou SA - par le taux d'expression des gènes dans le bouillon TS.

Pour ce qui est de la branche du « métabolisme général », les gènes sont majoritairement moins exprimés par SANB en croissance dans les laits SA + et SA – en comparaison avec SANB en croissance en contact avec le bouillon TS, sauf pour les gènes liés aux peptidases, au métabolisme des nucléotides ainsi qu’aux protéines liées à plusieurs voies métaboliques (Figure 13). Chez les peptidases, il y a une augmentation de l’expression du gène *aur*, codant pour une auréolysine, soit une zinc-métalloprotéinase, ainsi que du gène codant pour la staphopaine A (protéase V8), soit une cystéine-protéase qui dégrade l’élastine. Du côté des gènes codant pour des protéines au carrefour de plusieurs voies métaboliques, une phosphohydrolase ainsi que deux hydrolases de la famille HAD (*haloacid dehalogenase*) sont plus exprimés en croissance dans les laits SA + et SA – que lors de la croissance dans le bouillon TS. Au niveau du métabolisme des cofacteurs et des vitamines, les gènes liés à la synthèse de la riboflavine (*ribA*, *ribE* et *ribD*) sont généralement moins exprimés chez SANB en croissance dans les laits. Les transcrits associés au métabolisme de l’azote sont aussi moins prévalents, soit en moyenne 72,5 fois moins exprimés en croissance dans les laits.

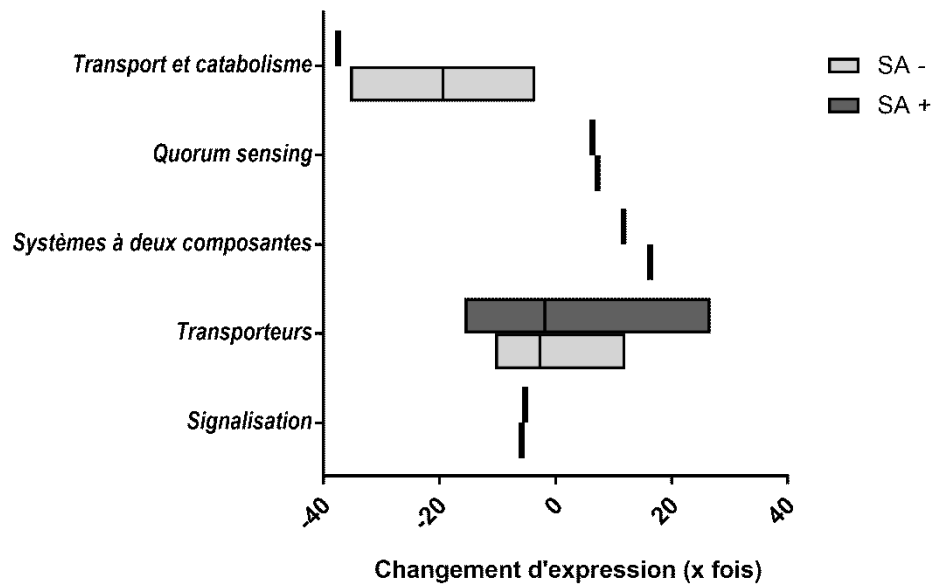


**Figure 13 : Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie du métabolisme général.**

Les données sont représentées par des boîtes de données minimales et maximales, ainsi qu'une ligne de moyenne. L'augmentation ou la diminution de l'expression est déterminée par la division du taux d'expression dans les laits SA + ou SA – par le taux d'expression des gènes dans le bouillon TS.

Au niveau des gènes associés aux processus cellulaires, les gènes liés au *quorum sensing* et aux systèmes à deux composants sont plus exprimés en croissance dans du lait (Figure 14). Le seul gène retrouvé dans la catégorie des systèmes à deux composants est un gène codant

pour une protéine de régulation de la famille TetR, lié à la répression de l'opérateur TetA, une protéine membranaire qui a comme rôle de pomper des substances toxiques pour la bactérie, comme des antibiotiques (Ramos *et al.*, 2005). La diguanylate cyclase, lié à la formation du biofilm chez *S. aureus*, est aussi plus exprimé dans les laits SA + et SA –, soit 6 et 7 fois plus exprimé respectivement. De plus le gène *hla*, précurseur de l'hémolysine  $\alpha$ , est 18 fois plus exprimé par SANB lorsqu'elle est en croissance dans le lait SA – comparé à sa croissance dans le bouillon TS. Au niveau des transporteurs, deux gènes étaient moins exprimés dans les deux types de lait, soit un gène lié à un transporteur de la superfamille majeure de facilitateurs (MFS), un gène lié à une perméase de la famille APC et le gène *lldP*, codant pour une L-lactate perméase. Finalement, un gène de la catégorie du transport et catabolisme est particulièrement moins exprimé, soit en moyenne 36 fois moins exprimé chez *S. aureus* Newbould en croissance dans les laits SA + et SA –. Il s'agit du gène *msrA*, qui est une réductase des méthionines sulfoxydées, lié à la protection des dommages cellulaires causés par les espèces réactives d'oxygène et le chlore (Gennaris *et al.*, 2015).



**Figure 14 : Changement au niveau de l'expression des gènes de la voie des processus cellulaires.**

Les données sont représentées par des boîtes de données minimales et maximales, ainsi qu'une ligne de moyenne. L'augmentation ou la diminution de l'expression est déterminée par la division du taux d'expression dans les laits SA + ou SA - par le taux d'expression des gènes dans le bouillon TS.

### **3.2.6 Différences au niveau du transcriptome : comparaison lait SA + vs lait SA –**

Deux types d'analyses ont été menées dans le cas suivant. Lors de la première, l'expression de SANB en croissance dans tous les laits SA – a été comparée à l'expression de SANB en croissance dans tous les laits SA + indifféremment de la provenance (vache). La deuxième consistait en l'analyse à l'intérieur du même animal de l'expression de SANB en croissance dans tous les laits SA – a été comparée à l'expression de SANB en croissance dans tous les laits SA +.

La première analyse, en comparant tous les échantillons SA – versus tous les échantillons SA + indifféremment de la provenance (vache), a donné 6 gènes exprimés de façon significativement différente dans le lait SA + (Tableau 8). Quatre sont issus de la voie du métabolisme, dont deux du métabolisme des glucides.

**Tableau 8 : Liste des gènes exprimés de façon significativement différente par SANB en croissance dans les laits SA + en comparaison avec son expression dans les laits SA – indifféremment de la provenance (vache).**

Gène	Fonction prédite de la protéine correspondante	Voie métabolique	Expression (x fois)	<i>p</i>
SAB0075	<i>deoD1</i> : phosphorylase du nucléoside purine	Métabolisme : métabolisme des nucléotides	↗ 112,5	0,01
SAB1854c	Lyase du pectate	Métabolisme : métabolisme des glucides	↗ 41,5	0,04
SAB2345c	Transporteur de la famille des MFS	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↗ 11,7	0,01
SAB1764c	<i>hemH</i> : ferrochélatase	Métabolisme : métabolisme des vitamines et cofacteurs	↗ 9,0	0,02
SAB0160	<i>uhpT</i> : protéines de transport de l'hexose phosphate	Traitement des informations environnementales : transduction du signal	↘ 16,9	0,04

↗ : augmentation des transcrits; ↘ diminution des transcrits.

La deuxième analyse consistait à l'analyse du transcriptome de SANB en croissance dans le lait SA + versus dans le lait SA – pour chaque animal individuellement. Aucun transcrit n'est commun parmi les vaches (Tableau 9).

Chez la vache 2, le seul gène qui a donné une protéine connue code pour une de ATPase lié à la synthèse de ribosomes qui est 12 fois moins exprimé en croissance le lait SA +. Chez la vache 3, 36 gènes sont exprimés de façon significativement différente par SANB en croissance dans le lait SA + comparé à lorsqu'il croît dans le lait SA – (Tableau 9). Parmi les gènes le plus exprimés dans le lait SA +, il y a celui qui code pour le précurseur du composé A de la



gamma hémolysine, *hlgA*, qui est 282 fois plus exprimé, ainsi qu'un gène codant pour une protéine provenant de l'îlot de pathogénicité bovin qui est 180 fois plus exprimé. De plus, un gène codant pour une protéine de liaison à la fibronectine est aussi significativement plus exprimé en croissance dans le lait SA +, soit environ 53 fois plus exprimé.

Chez le lait SA + de la vache 4, 5 gènes sont exprimés de façon significativement différente (Tableau 9). Deux gènes sont plus exprimés, soit *cztA*, un répresseur du transport du zinc et du cobalt qui est 65 fois plus exprimé et un gène codant pour une composante du système de transport de la biotine qui est 42 fois plus exprimé. À l'inverse, un gène codant pour une protéine de stress générale 20U, soit une protéine de liaison à l'ADN inductible par la famine, est 14 fois moins exprimé.

Finalement, chez la vache 6, 13 gènes sont exprimés de façon significativement différente lors de la croissance de *S. aureus* dans le lait SA + (Tableau 9). Deux d'entre eux sont particulièrement surexprimés. Le premier gène code pour *cps2h*, un gène lié à la synthèse de la capsule, qui est  $1,6 \times 10^6$  fois plus exprimé. L'autre est une probable phosphoglycérate mutase, qui est environ 3000 fois plus exprimé. À l'inverse, deux gènes sont particulièrement sous exprimés, soit un gène codant pour la sous-unité B de l'antiporteur  $\text{Na}^+:\text{H}^+$  et un gène codant pour un activateur de la transcription de l'opéron de l'enzyme glutamate synthase qui sont respectivement 976 et 966 fois moins exprimés.

**Tableau 9 : Liste des gènes exprimés de façon significativement différente par SANB en croissance dans les laits SA + en comparaison avec son expression dans les laits SA – analysé selon la vache.**

<b>Vache 2</b>				
<b>Gène</b>	<b>Fonction prédite de la protéine correspondante</b>	<b>Voie métabolique</b>	<b>Expression (x fois)</b>	<b><i>p</i></b>
SAB0140	Protéine hypothétique	Inconnue	↗ 2122,8	0,002
SAB1348c	Probable lipoprotéine	Inconnue	↗ 22,6	0,03
SAB2175	Probable protéine membranaire	Inconnue	↘ 77,8	0,001
SAB0314	ATPase de liaison au ribosome	Traitement des informations génétiques : Biogénèse des ribosomes	↘ 12,8	0,01
<b>Vache 3</b>				
<b>Gène</b>	<b>Fonction prédite de la protéine correspondante</b>	<b>Voie métabolique</b>	<b>Expression (x fois)</b>	<b><i>p</i></b>
SAB2575	Arylamine N-acétyltransférase	Métabolisme : multiples voies métaboliques	↗ 402,3	0,0009
SAB0214	Probable choloylglycine hydrolase lié à la pénicilline	Métabolisme : métabolisme des lipides	↗ 330,1	0,01
SAB2300	<i>hlgA</i> ; précurseur du composé A de la gamma hémolysine	Signalisation et processus cellulaire: toxines bactériennes	↗ 282,2	0,02
SAB0920c	Probable protéine de la famille des acétyltransférase	Inconnue	↗ 268,9	0,009
SAB0348	Protéine de l'îlot de pathogénicité bovin (Orf17)	Signalisation et processus cellulaire: pathogénicité	↗ 180,5	0,02
SAB0157	Probable déshydrogénase dépendante du NADH	Inconnue	↗ 156,1	0,01
SAB0765	Protéine hypothétique	Inconnue	↗ 56,3	0,004

SAB2319c	Phosphohydrolase	Métabolisme : multiples voies métaboliques	↗ 55,7	0,01
SAB1291c	Protéine de surface tronquée de liaison à la fibronectine	Inconnue	↗ 52,9	0,0002
SAB0809	Antiporteur sodium :proton	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↗ 29,2	0,01
SAB0985c	Glycérophosphodiester phosphodiesterase	Métabolisme : métabolisme des lipides	↗ 25,9	0,02
SAB0422	<i>gltB</i> ; petite sous-unité de la glutamate synthase	Métabolisme: métabolisme de l'azote	↗ 23,3	0,03
SAB1204	Exonucléase: protéine de réparation de l'ADN SbcC/Rad50	Réplication et réparation: réparation de l'ADN et recombinaison	↗ 19,0	0,03
SAB0761	Protéine hypothétique	Inconnue	↗ 16,5	0,0007
SAB2514	Probable protéine exportée	Inconnue	↗ 15,2	0,008
SAB2018	<i>luxS</i> ; protéine de production autoinductrice-2	Métabolisme: métabolisme des acides aminés	↗ 14,5	0,01
SAB2173c	Probable antiporteur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> tronqué	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↗ 13,1	0,01
SAB2490c	<i>nrdG</i> ; petite sous-unité de la ribonucleotide reductase anaérobie	Métabolisme: métabolisme des purines	↗ 12,5	0,05
SAB1781c	Système à deux composantes de la famille NarL: régulateur de réponse	Signalisation et processus cellulaires: système à deux composantes	↗ 11,8	0,03
SAB0332	FMN réductase (NADPH)	Métabolisme: métabolisme des vitamines et cofacteurs	↗ 9,1	0,03
SAB1365c	Ribonucléase Z: probable métallo-béta- lactamase	Traitement des informations génétiques: biosynthèse d'ARNt	↗ 8,7	0,03

SAB0796	Glycérate déshydrogénase	Métabolisme: métabolisme des acides aminés	↗ 7,8	0,002
SAB1993c	<i>atpB</i> ; chaîne A de l'ATP synthase	Métabolisme: phosphorylation oxydative	↗ 7,6	0,005
SAB0108	<i>aldA</i> ; aldéhyde déshydrogénase	Métabolisme: métabolisme des glucides	↗ 6,2	0,0009
SAB0883c	UDP-glucose diacylglycérole glucosyltransférase	Métabolisme : métabolisme des lipides	↗ 5,9	0,03
SAB0207c	Méthyltransférase dépendante de la classe 1 de SAM	Traitement des informations génétiques: biosynthèse d'ARNt chargé	↗ 5,5	0,05
SAB1555	<i>cycA</i> ; transporteur de D-sérine, D-alanine, glycine	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↗ 4,7	0,01
SAB1494	Probable oxygénase	Inconnue	↗ 3,8	0,02
SAB2533	Protéine hypothétique	Inconnue	↗ 3,3	0,01
SAB0199	<i>lytS</i> ; histidine kinase senseur à 2 composantes	Traitement des informations environnementales: transduction du signal	↘ 39,9	0,009
SAB1530c	<i>hemC</i> ; porphobilinogène déaminase	Métabolisme: métabolisme des vitamines et cofacteurs	↘ 22,0	0,05
SAB2010	Protéine hypothétique	Inconnue	↘ 10,1	0,02
SAB2412c	<i>glcB</i> ; composé du système glucose-spécifique PTS IIABC	Métabolisme: métabolisme des glucides	↘ 7,8	0,05
SAB2494c	<i>cysJ</i> ; flavoprotéine réductrice de sulfure	Métabolisme: métabolisme du soufre	↘ 7,0	0,03
SAB0594	Protéine de transport de la purine	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↘ 6,8	0,01

SAB2062	<i>SfaD</i> ; staphyloferrin A synthase	Métabolisme: métabolisme des acides aminés	↘ 2,5	0,02
<b>Vache 4</b>				
Gène	Fonction prédite de la protéine correspondante	Voie métabolique	Expression (x fois)	<i>p</i>
SAB2029	<i>czrA</i> ; répresseur du transport du zinc et du cobalt	Traitement des informations génétiques: facteurs de transcription	↗ 65,4	0,04
SAB2154c	Composé du système de transport de la biotine spécifique au substrat	Traitement des informations environnementales: transporteurs ABC	↗ 42,0	0,05
SAB0159c	Protéine hypothétique	Inconnue	↘ 170,4	0,006
SAB1919	Hydrolase de la famille de l'azote-carbone	Métabolisme: métabolisme des acides aminés	↘ 62,0	10 <sup>-6</sup>
SAB2023c	Protéine de stress générale 20U: protéine de liaison à l'ADN inducible par la famine	Traitement des informations génétiques: chromosomes et protéines associées	↘ 14,2	0,004
<b>Vache 6</b>				
Gène	Fonction prédite de la protéine correspondante	Voie métabolique	Expression (x fois)	<i>p</i>
SAB0070	<i>cps2h</i> ; biosynthèse de la capsule	Métabolisme : synthèse des lipopolysaccharides	↗ 1,6 x 10 <sup>6</sup>	0,0001
SAB0756	Probable phosphoglycérate mutase	Inconnue	↗ 2999,6	0,0002
SAB1475c	Transporteur de cations métalliques divalent	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↗ 524,5	0,02
SAB0122c	Acétylglutamate kinase	Métabolisme: métabolisme des acides aminés	↗ 130,0	0,03
SAB2060c	<i>SfaB</i> ; staphyloferrin A synthase	Métabolisme: métabolisme des acides aminés	↗ 43,1	3,6 x 10 <sup>-6</sup>

SAB0574	Sous-unité B de l'antiporteur Na <sup>+</sup> :H <sup>+</sup>	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↘ 976,6	0,004
SAB0420c	Activateur de la transcription de l'opéron de la glutamate synthase	Traitement des informations génétiques: facteurs de transcription	↘ 965,9	0,01
SAB0030	Dihydroneoptérine aldolase	Métabolisme: métabolisme des vitamines et cofacteurs	↘ 489,1	0,05
SAB0071	Probable transporteur de lipopolysaccharides	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↘ 199,8	0,03
SAB1582	D-3-phosphoglycérate déshydrogénase / 2-oxoglutarate réductase	Métabolisme : métabolisme du méthane	↘ 198,9	0,01
SAB0201	<i>lrgA</i> ; protéine analogue à l'holine A	Signalisation et processus cellulaires: système à deux composantes	↘ 20,2	0,002
SAB0033c	Dihydrouridine synthase	Traitement des informations génétiques: biosynthèse d'ARNt	↘ 19,7	0,03
SAB0816c	<i>mnhD</i> ; sous-unité de l'antiporteur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	Signalisation et processus cellulaires: transporteurs	↘ 10,4	0,0005

↗ : augmentation des transcrits; ↘ diminution des transcrits.

### 3.2.7 Modifications d'expression des gènes liés au processus infectieux

En utilisant KEGG, les gènes liés au processus infectieux, ainsi qu'à la formation du biofilm et au système *agr* ont été utilisés pour filtrer les séquences et analyser les différences dans l'expression génétique. Plusieurs gènes du processus infectieux n'étaient pas exprimés du tout, comme les précurseurs de leucocidines et les entérotoxines. Ce filtre nous a donné 45 gènes liés à la production d'exotoxines, d'hémolysines, de protéine de liaisons au fibrinogène et à la fibronectine, ainsi que des gènes du système *agr* et *ica*. Les différences d'expression de ces gènes sont majoritairement non-significatives, et les gènes dont l'expression était significativement différente ont déjà été couverts dans les sections précédentes.

Dans le tableau 10, l'expression des gènes liés à la virulence, au quorum sensing ainsi qu'à la production du biofilm est analysée en fonction de la transcriptomique de SANB en croissance dans tous les laits SA – et tous les laits SA + comparé à la croissance de SANB dans le bouillon TS, ainsi que SANB en croissance dans les laits SA + versus SANB en croissance dans les laits SA –. De façon générale, il y a peu de variation dans l'expression, mais certains gènes ressortent comme *hla*, *clfB*, les gènes codant pour deux protéines de liaison à la fibronectine tronquées et le gène codant pour une protéine de transport ABC liée à l'ATP, qui ont déjà été listés comme étant exprimé de façon significativement différente dans la section antérieure. Certains gènes sont aussi exprimés de façon différente, sans que ce soit significatif. Par exemple, *hlgA* est 10,8 et 18,8 fois plus exprimé par SANB en croissance dans le lait SA – et SA + respectivement en comparaison avec l'expression lors de la croissance dans le bouillon TS (témoin). À l'inverse, *hlgB* est 12,6 et 7,4 fois moins exprimé par SANB dans le lait SA – et SA + respectivement en comparaison avec son expression dans le bouillon TS. Le gène *set11* codant pour l'exotoxine 11 ressort de son groupe, avec une augmentation d'expression de 19,1 et 5,1 fois pour les conditions SA – et SA + respectivement, tandis que les autres exotoxines

démontrent peu ou pas de modification au niveau de leur expression. De ce même constat, le gène *lukD*, codant pour une sous-unité de la leucotoxine D, est lui aussi 59,9 et 8,8 fois plus exprimé par SANB en croissance dans les laits SA – et SA + respectivement en comparaison avec sa croissance dans le bouillon TS.

En regardant ces données, puis en regroupant des gènes dans des catégories, le groupe de gènes codant pour les protéines de liaison à la fibronectine est significativement ( $p = 0,014$ ) plus exprimé par SANB en croissance dans le lait SA +, en comparaison avec sa croissance dans le témoin, que lorsque SANB est en croissance dans le lait SA – en comparaison avec le témoin.

Individuellement, c'est-à-dire si on analyse le triplicata de croissance dans un type de lait chez une vache versus les témoins, toutes les conditions montraient une augmentation des transcrits de *hla*, de *dltA*, d'*agrC* et d'une protéine de liaison à la fibronectine tronquée. Inversement, dans toutes les conditions de croissance en comparaison avec les témoins, il y avait une diminution des transcrits des gènes *hlgB*, de la sous-unité de la leucocidine F, de *spsB*, et d'*ebpS*.

Puis, si on observe l'expression de SANB dans tous les laits SA + versus son expression dans tous les laits SA –, on voit peu de changements, excepté pour les gènes codant pour des protéines de liaison à la fibronectine, dont l'expression augmente dans les laits SA +. Il y a aussi une augmentation des transcrits liés à une protéine de l'îlot de pathogénicité bovine. Individuellement, ce gène est 17 fois moins exprimé par SANB dans le lait SA + de la vache



2, en comparaison avec son expression dans le lait SA –. Cependant, il est 180, 11 et 47 fois plus exprimé par SANB en croissance dans les laits des vaches 3, 4 et 6 respectivement.

Si on analyse individuellement, l'expression de certains gènes est grandement modifiée. Par exemple, le gène *rot* qui code pour un répresseur de transcription de facteurs de virulence est 159 fois moins exprimé par SANB en croissance dans le lait SA + de la vache 2, montrant qu'il est grandement exprimé dans le lait SA – de cette vache. À l'inverse, son expression n'est presque pas modifiée dans les autres laits. Chez la vache 2, les gènes d'adhésion intracellulaire de l'opéron *ica*, importants dans la production de biofilm, sont tous moins exprimés dans le lait SA +, inversement à l'expression de SANB dans le lait SA + des autres vaches. Chez la vache 4, le gène codant pour la sous-unité C de l'hémolysine gamma est 232 fois moins exprimé par SANB dans le lait SA +. Chez la vache 6, le gène pour la leucotoxine D est 471 fois moins exprimé par SANB dans le lait SA +.

**Tableau 10 : Liste des gènes liés au processus infectieux exprimés par SANB en croissance dans les laits et le bouillon TSB.**

Gène	Fonction prédite de la protéine correspondante	SA – vs TSB	<i>p</i>	SA + vs TSB	<i>p</i>	SA + vs SA –	<i>p</i>
SAB1027c	<i>hla</i> ; précurseur de l'hémolysine	↗ 18,9	0,002	↗ 5,6	>0,05	↘ 1,4	>0,05
SAB2301	<i>hlgC</i> ; unité C de la gamma hémolysine	↗ 8,6	>0,05	↘ 1,9	>0,05	↘ 4,6	>0,05
SAB2302	<i>hlgB</i> ; unité B de la gamma hémolysine	↘ 12,6	>0,05	↘ 7,4	>0,05	↗ 1,8	>0,05
SAB2300	<i>hlgA</i> ; précurseur du composé A de la gamma hémolysine	↗ 10,8	>0,05	↗ 18,8	>0,05	↗ 1,7	>0,05

Gène	Fonction prédite de la protéine correspondante	SA – vs TSB	<i>p</i>	SA + vs TSB	<i>p</i>	SA + vs SA –	<i>p</i>
SAB2051c	Probable hémolysine	↘ 1,5	>0,05	↘ 1,4	>0,05	↗ 1,3	>0,05
SAB1874	Bêta hémolysine	↗ 1,3	>0,05	↘ 1,5	>0,05	↘ 1,8	>0,05
SAB1686c	<i>lukD</i> ; sous-unité de la leucotoxine D	↗ 59,9	>0,05	↗ 8,8	>0,05	↘ 1,9	>0,05
SAB1687c	<i>lukE</i> ; sous-unité de la leucotoxine E	↘ 10,9	>0,05	↘ 4,9	>0,05	↗ 2,4	>0,05
SAB1875c	Probable sous-unité de la leucotoxine F	↘ 3,5	>0,05	↘ 3,1	>0,05	↗ 1,2	>0,05
SAB1876c	Probable sous-unité S de la leucocidine	↗ 1,5	>0,05	↘ 1	>0,05	↘ 1,5	>0,05
SAB1037c	Probable toxine exfoliative	↗ 2,4	>0,05	↗ 2,1	>0,05	↘ 1,1	>0,05
SAB0376	<i>set11</i> ; Exotoxine 11	↗ 19,1	>0,05	↗ 5,1	>0,05	↘ 3,7	>0,05
SAB0379	<i>set7</i> ; Exotoxine 7	↘ 2,4	>0,05	↘ 1,1	>0,05	↗ 2,2	>0,05
SAB0380	<i>set5</i> ; Exotoxine 5	↘ 1,1	>0,05	↗ 1,9	>0,05	↗ 2,3	>0,05
SAB0513	Protéine de liaison au fibrinogène/sialoprotéine	↗ 3,7	>0,05	↗ 1,9	>0,05	↘ 1,9	>0,05
SAB1022	Précurseur de protéine de liaison au fibrinogène	↘ 4,6	>0,05	↘ 1,6	>0,05	↗ 3	>0,05
SAB1021	<i>fib</i> ; Protéine de liaison au fibrinogène	↘ 1,1	>0,05	↗ 6,1	>0,05	↗ 1,9	>0,05
SAB2375c	<i>fnbA</i> ; protéine de liaison à la fibronectine	↘ 7,4	>0,05	↗ 1,3	>0,05	↗ 9,8	>0,05
SAB1292c	Protéine de liaison à la fibronectine tronquée	↗ 1,6	>0,05	↗ 100,0	0,02	↗ 8,2	>0,05
SAB1291c	Protéine de liaison à la fibronectine tronquée	↗ 1,4	>0,05	↗ 2,1	>0,05	↘ 1,4	>0,05
SAB1300c	Protéine de liaison à la fibronectine tronquée	↗ 1,8	>0,05	↗ 44,7	0,05	↗ 7,8	>0,05

Gène	Fonction prédite de la protéine correspondante	SA – vs TSB	<i>p</i>	SA + vs TSB	<i>p</i>	SA + vs SA –	<i>p</i>
SAB0744	<i>clfA</i> ; facteur d'agglutination tronqué	↘ 1,2	>0,05	↘ 1,1	>0,05	↗ 1,2	>0,05
SAB2505c	<i>clfB</i> ; facteur d'agglutination 5	↘ 6,5	0,008	↘ 4,5	>0,05	↗ 1,5	>0,05
SAB2540c	Régulateur de transcription de l'opéron <i>ica</i>	↗ 1,8	>0,05	↘ 1	>0,05	↘ 1,7	>0,05
SAB2541	<i>icaA</i> ; glucosaminyltransférase de la protéine d'adhésion intracellulaire A	↗ 2,9	>0,05	↗ 6,7	>0,05	↘ 1,1	>0,05
SAB2543	<i>icaB</i> ; protéine d'adhésion intracellulaire B	↗ 2,6	>0,05	↗ 2,3	>0,05	↘ 1,1	>0,05
SAB2544	<i>icaC</i> ; protéine d'adhésion intracellulaire C	↘ 1,9	>0,05	↘ 1,3	>0,05	↗ 1,5	>0,05
SAB2542	<i>icaD</i> ; protéine d'adhésion intracellulaire D	ND	ND	↗ 1,8	>0,05	↗ 3,2	>0,05
SAB0798	<i>dltA</i> ; ligase de transport de la D-alanine-D-alanyle	↗ 2,9	>0,05	↗ 2,7	>0,05	↘ 1,1	>0,05
SAB0799	<i>dltB</i> ; protéine d'estérification de l'acide téichoïque et de la D-alanine	↗ 1,1	>0,05	↗ 1,2	>0,05	↗ 1,1	>0,05
SAB0800	<i>dltC</i> ; protéine de transport de la D-alanyle	↘ 2,7	>0,05	↘ 2,6	>0,05	↗ 1,1	>0,05
SAB0801	<i>dltD</i> ; protéine sécrétée d'estérification de l'acide lipotéichoïque et l'acide téichoïque	↗ 2,5	>0,05	↗ 1,8	>0,05	↘ 1,3	>0,05
SAB0833	<i>spsA</i> ; peptidase de signal de type I	↘ 1,2	>0,05	↘ 2,7	>0,05	↘ 2,3	>0,05

Gène	Fonction prédite de la protéine correspondante	SA – vs TSB	<i>p</i>	SA + vs TSB	<i>p</i>	SA + vs SA –	<i>p</i>
SAB0834	<i>spsB</i> ; peptidase de signal de type I	↘ 2,9	>0,05	↘ 6,3	>0,05	↘ 1,9	>0,05
SAB2167c	<i>sarR</i> ; staphylococcal accessory regulator protein	↘ 1,1	>0,05	↗ 1,4	>0,05	↗ 1,3	>0,05
SAB1920	<i>agrB</i> ; régulateur du gène accessoire B	↗ 1,6	>0,05	↗ 1,8	>0,05	↗ 1,1	>0,05
SAB1922	<i>agrC</i> ; régulateur du gène accessoire C	↗ 1,3	>0,05	↗ 1,9	>0,05	↗ 1,5	>0,05
SAB1923	<i>agrA</i> ; régulateur du gène accessoire A	↘ 2,1	>0,05	↘ 2,8	>0,05	↘ 1,3	>0,05
SAB0994c	<i>isdB</i> ; protéine de liaison à la transferrine	↗ 2,4	>0,05	↘ 1,4	>0,05	↘ 3,3	>0,05
SAB2298	<i>sbi</i> ; protéine de liaison à l'immunoglobuline G	↗ 2,2	>0,05	↘ 1	>0,05	↘ 2,1	>0,05
SAB0610	Protéine de transport ABC liée à l'ATP	↗ 11,5	0,04	↗ 7,6	>0,05	↘ 1,5	>0,05
SAB0611	Perméase de transporteur ABC	↗ 2,2	>0,05	↗ 1,4	>0,05	↘ 1,6	>0,05
SAB1216	<i>mprF</i> ; probable protéine membranaire	↘ 2,4	>0,05	↘ 1,3	>0,05	↗ 1,9	>0,05
SAB1622c	<i>rot</i> ; régulateur de transcription « répresseur de toxines »	↘ 1,5	>0,05	↘ 1,8	>0,05	↘ 1,2	>0,05
SAB1343c	<i>ebpS</i> ; protéine de liaison à l'élastine	↘ 3	>0,05	↘ 3,6	>0,05	↘ 1,1	>0,05
SAB0348	Protéine de l'îlot de pathogénicité bovin (Orf17)	↘ 10,2	>0,05	↘ 1,2	>0,05	↗ 9,0	>0,05

↗ : augmentation des transcrits; ↘ : diminution des transcrits, \* : significatif.

### **3.3 Effets de différentes souches de *Staphylococcus aureus* sur le microbiote d'un lait considéré comme sain**

#### **3.3.1 Sélection des souches de *S. aureus***

Lors d'études antérieures sur des souches de *S. aureus* isolées de cas de mammites, le typage moléculaire par séquençage du gène *spa* a démontré qu'au moins 18 types *spa* existaient à travers le Canada (Veh 2014; Pichette-Jollette 2016). Cinq types sont retrouvés de façon majoritaire au Canada : t529, t267, t13401, t605 et t2445. Certains clones possèdent aussi des marqueurs associés ou non à la persistance de l'infection : toxines codées par les gènes *seg* et *tst* par exemple.

Les souches utilisées ont été sélectionnées selon une moyenne représentative de chaque type *spa* au niveau de la production de biofilm et de facteurs de virulence (Tableau 11). Certaines souches proviennent d'IIM persistantes tandis que d'autres n'ont pas perdurées. De plus, les temps d'échantillonnage sont aussi variés (lors du tarissement, lors de mammites, etc.). Les souches Sa2539 et Newbould 305 ont été ajoutées puisqu'elles sont régulièrement utilisées comme souches témoins. La souche 1158c est une souche de *S. aureus* résistante à la méthicilline (SARM) retrouvée dans un cas de mammite bovine et est donc intéressante à utiliser.

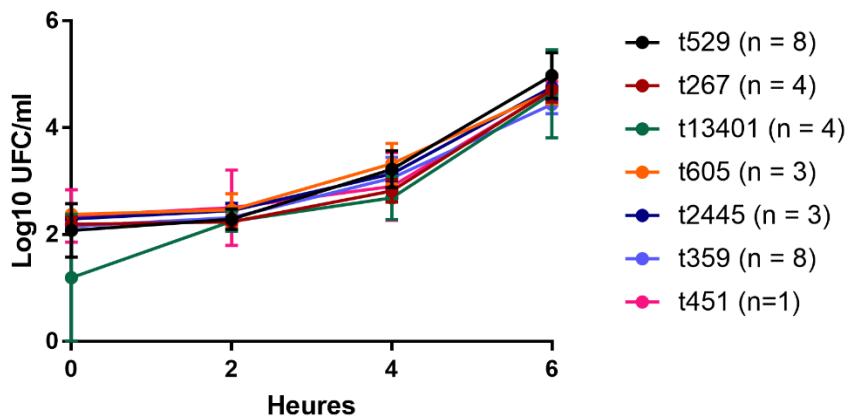
**Tableau 11 : Liste des souches de *S. aureus* sélectionnées pour l'inoculation du lait sain.**

<b>Souches</b>	<b>Persistante<sup>a</sup></b>	<b>Période<sup>b</sup></b>	<b><i>spa</i><sup>c</sup></b>	<b><i>seg</i><sup>d</sup></b>	<b><i>tst</i><sup>e</sup></b>	<b><i>lukM</i><sup>f</sup></b>	<b>Biofilm<sup>g</sup></b>
<b>Sa3014</b>	Oui	M	t359	-	-	+	0,7
<b>Sa3022</b>	Oui	M	t359	-	-	+	1,5
<b>Sa3199</b>	Oui	M	t359	-	-	+	2,9
<b>Sa3137</b>	Oui	T	t605	-	-	-	2,9
<b>Sa3131</b>	Oui	T	t605	-	-	-	3,2
<b>Sa3129</b>	Oui	T	t605	-	-	-	1,9
<b>Sa3454</b>	Oui	M	t2445	-	-	+	0,7
<b>Sa3456</b>	Oui	M	t2445	-	-	+	0,8
<b>Sa3468</b>	Oui	M	t2445	-	-	+	1,2
<b>Sa3493</b>	Oui	L	t267	-	-	+	1,1
<b>Sa3003</b>	Oui	L	t267	-	-	+	0,9
<b>Sa3353</b>	Oui	L	t267	-	-	+	0,8
<b>Sa3213</b>	Oui	M	t529	+	-	+	0,8
<b>Sa3511</b>	Oui	M	t529	+	-	+	1,1
<b>Sa3154</b>	Oui	M	t529	+	+	+	0,9
<b>Sa3281</b>	Oui	M	t529	+	+	+	0,5
<b>Sa3498</b>	Oui	L	t529	+	-	+	1,0
<b>Sa2539</b>	Oui	L	t529	+	-	+	1,0
<b>Sa2978</b>	Non	L	t529	+	-	+	1,1
<b>Sa3370</b>	Non	L	t529	+	-	+	1,1
<b>Sa2117</b>	Oui	L	t13401	-	-	-	3,2
<b>Sa2925</b>	Oui	L	t13401	-	-	-	3,6
<b>Sa2911</b>	Non	L	t13401	-	-	-	4,3
<b>Sa3071</b>	Non	L	t13401	-	-	-	3,3
<b>Newbould</b>	ND	ND	t267	+	-	+	0,7
<b>Sa1158c</b>	ND	ND	t451	-	-	-	1,1

<sup>a</sup> La persistance est confirmée par l'analyse de la souche à deux différents moment de l'infection; <sup>b</sup> Période à la prise de l'échantillon (M : mammite; T : tarissement; L : lactation); <sup>c</sup> Le type *spa* est confirmé via séquençage; <sup>c,d,e</sup> Tous les gènes de virulence sont confirmés par PCR; <sup>f</sup> La valeur du biofilm est obtenue par le calcul de la densité optique lors d'une coloration au crystal violet, puis normalisé sur les données de la souche Sa2539.

### 3.3.2 Courbes de croissance

Les courbes de croissance obtenues suite à l'inoculation du lait SA – de la vache 2 avec la sélection de souches de *S. aureus* ne démontrent aucune différence de croissance d'un type *spa* à l'autre (Figure 15). Le lait SA – de la vache 2 a été sélectionné car il démontrait une forte diversité bactérienne (28 espèces) en plus d'un nombre élevé de séquences (environ 5700 en moyenne). Il était donc un candidat idéal pour voir l'effet des souches de *S. aureus* sur la diversité microbienne du lait.



**Figure 15 :** Log10 des UFC/ml de souches de *S. aureus* déterminé par décompte sur gélose mannitol-sel à certaines heures lors de la coculture dans le lait SA – de la vache 2, trié selon leur type *spa*.

### **3.3.3 Concentration d'ADN obtenu**

Les concentrations d'ADN obtenues suite au protocole d'extraction avec la trousse PowerFood de Qiagen sont démontrées dans le Tableau 12.



**Tableau 12 : Concentration d'ADN des aliquots de lait SA – de la vache 2 après inoculation avec les souches de *S. aureus*, et suite au traitement PMA et l'extraction d'ADN avec la trousse PowerFood de Qiagen.**

<b>Souches</b>	<b>Concentrations d'ADN (ng/μl)</b>	
<b>Sa3014</b>	7,6	ND
<b>Sa3022</b>	6,7	ND
<b>Sa3199</b>	18,8	8,6
<b>Sa3137</b>	8,3	8,4
<b>Sa3131</b>	8,1	7,3
<b>Sa3129</b>	8,8	5,8
<b>Sa3454</b>	11,5	9,3
<b>Sa3456</b>	10,0	7,5
<b>Sa3468</b>	11,1	8,7
<b>Sa3493</b>	8,9	9,0
<b>Sa3003</b>	6,7	8,3
<b>Sa3353</b>	10,0	5,4
<b>Sa3213</b>	12,8	9,0
<b>Sa3511</b>	6,7	4,4
<b>Sa3154</b>	6,5	ND
<b>Sa3281</b>	11,1	9,4
<b>Sa3498</b>	10,0	12,1
<b>Sa2539</b>	6,6	7,6
<b>Sa2978</b>	7,9	7,6
<b>Sa3370</b>	7,1	10,8
<b>Sa2117</b>	10,9	6,6
<b>Sa2925</b>	7,4	8,0
<b>Sa2911</b>	6,5	3,9
<b>Sa3071</b>	7,9	8,5
<b>Newbould</b>	6,8	5,0
<b>Sa1158c</b>	3,4	6,0
<b>Témoin <sup>a</sup></b>	13,3	5,7

<sup>a</sup> Lait SA – de la vache 2 incubé dans les mêmes conditions sans inoculation avec *S. aureus*.

#### **3.3.4 Résultats des qPCR**

Les concentrations d'ADN obtenu suite aux cycles de qPCR sont présentées dans le tableau 13.

**Tableau 13 : Concentration d'ADN des aliquots des laits SA – inoculés de la vache 2 obtenu après le premier et le deuxième cycle d'amplification au qPCR et de purification par SPRI.**

<b>Souches</b>	<b>Concentrations d'ADN après SPRI #1 (ng/μl)</b>		<b>Concentrations d'ADN après SPRI #2 * (ng/μl)</b>	
Sa3014	6,7	16,6	1,8	ND
Sa3022	11,5	9,5	4,1	3,1
Sa3199	15,1	9,2	1,4	ND
Sa3137	11,3	14,3	3,4	3,7
Sa3131	5,6	3,2	2,3	3,0
Sa3129	9,8	8,3	2,4	3,7
Sa3454	3,6	7,8	4,7	4,8
Sa3456	4,8	7,5	2,2	1,9
Sa3468	10,3	6,9	0,3	0,3
Sa3493	3,8	8,5	3,5	3,9
Sa3003	9,6	7,8	3,4	3,6
Sa3353	4,7	14,3	3,7	3,2
Sa3213	17,6	25,1	1,4	1,1
Sa3511	6,4	5,3	6,3	5,3
Sa3154	10,4	7,0	1,9	2,4
Sa3281	6,1	4,2	1,6	1,2
Sa3498	3,6	9,6	1,2	3,5
Sa2539	6,2	2,9	2,4	2,9
Sa2978	18,7	40,8	1,4	ND
Sa3370	9,4	5,6	3,2	3,9
Sa2117	6,1	5,2	6,2	4,4
Sa2925	17,0	16,7	0,9	1,4
Sa2911	3,9	12,1	2,1	1,6
Sa3071	21,1	40,5	1,2	0,8
Newbould	6,7	10,3	2,5	3,7
Sa1158c	17,4	25,9	3,8	7,4
Témoins	2,9	3,2	8,6	4,2

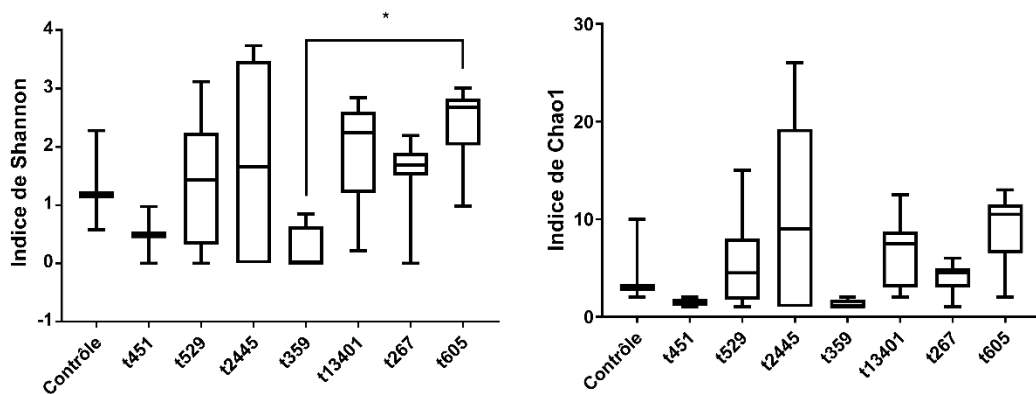
**\*Obtenu par la technique de dosage PicoGreen avant l'envoi au séquençage.**

### 3.3.5 Généralités du séquençage

En prenant en compte tous les duplicatas et les témoins, 55 échantillons ont été séquencés. De ces échantillons, trois ont été éliminés de l'analyse parce qu'ils ne contenaient aucune séquence. Le lait SA – de la vache 2 ayant été inoculé avec les souches Sa2978, Sa3014 et Sa3199 n'a donc pas de duplicata. Au total, 528 731 séquences ont été alignées, ce qui donne une moyenne de  $10\,168 \pm 6\,357$  séquences par échantillons. De ces séquences, 3 phyla ont été identifiés, soit les *Actinobactéries*, les *Firmicutes* et les *Protéobactéries*, ainsi que 9 genres bactériens. De ces 528 731 séquences, 95 % sont alignées sur le génome de *S. aureus*.

### 3.3.6 Diversité et richesse des échantillons

Les indices de Shannon et de Chao1 ne démontrent aucune différence significative entre le témoin (lait SA – de la vache 2 non-inoculé avec les souches de *S. aureus*) et les échantillons de lait SA – de la vache 2 inoculés avec *S. aureus* de différents types *spa* (Figure 16). La seule différence significative observée est l'indice de Shannon de t359 qui est significativement plus bas que l'indice de t605. Les indices de Shannon et de Chao1 du témoin sont plus élevés que ceux des types *spa* t359 et t451, mais sont plus petits que tous les autres.



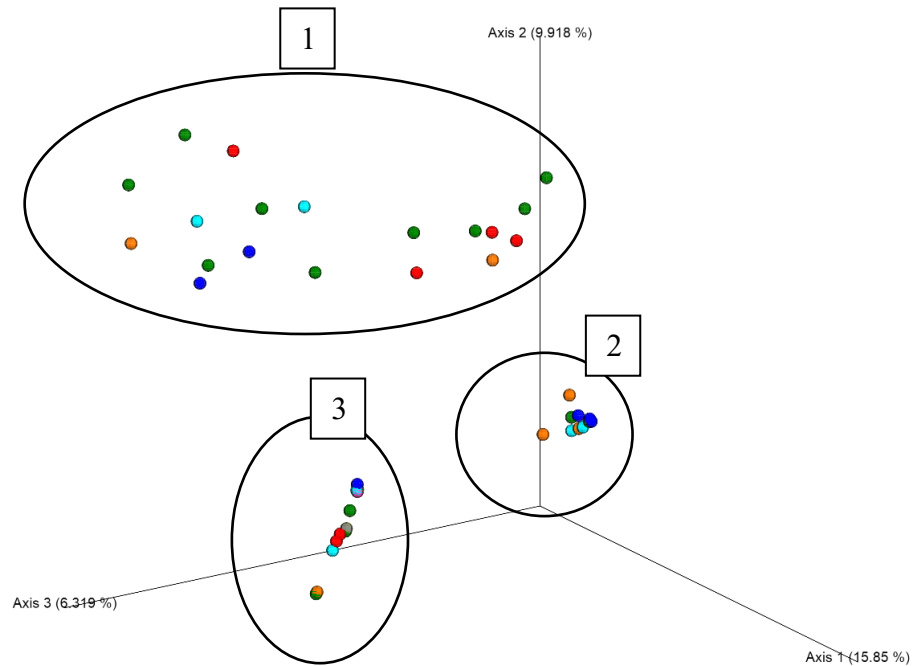
**Figure 16 : Indices de Shannon et de Chao1 calculés avec QIIME2 en fonction du type *spa* des souches inoculées.**

Statistiques calculées avec le test « One-Way ANOVA » sur GraphPad Prism 7,02. \*  $p = 0,04$

Le graphique dissimilarité de Bray-Curtis démontre une séparation en trois nuages des points associés à chaque échantillon (Figure 17). Il ne semble pas y avoir de corrélations, hormis le

fait que tous les témoins, ainsi que les types spa t451 et t359 se retrouvent tous dans le nuage

3. De plus, le nuage 2 ne contient aucun point appartenant au type spa t605.

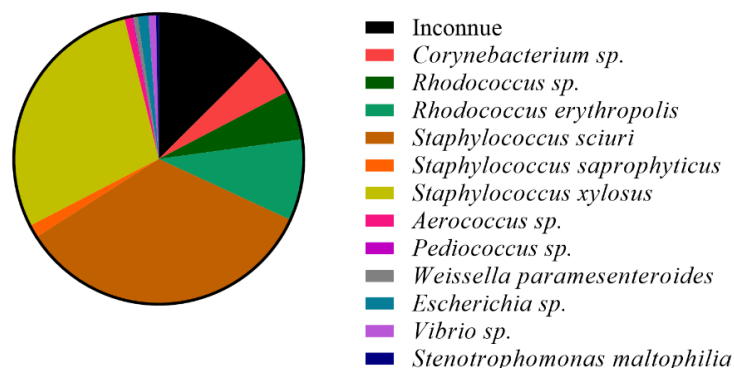


**Figure 17 : Graphique de dissimilarité de Bray-Curtis calculé avec QIIME2 en fonction du type *spa* des souches inoculées.**

En rouge : t605; bleu foncé : t2445; bleu pâle : t13401; jaune : t451; orange : t267; gris : t359; vert : t529; rose : témoins sans *S. aureus*

### 3.3.7 Analyse des prévalences bactériennes

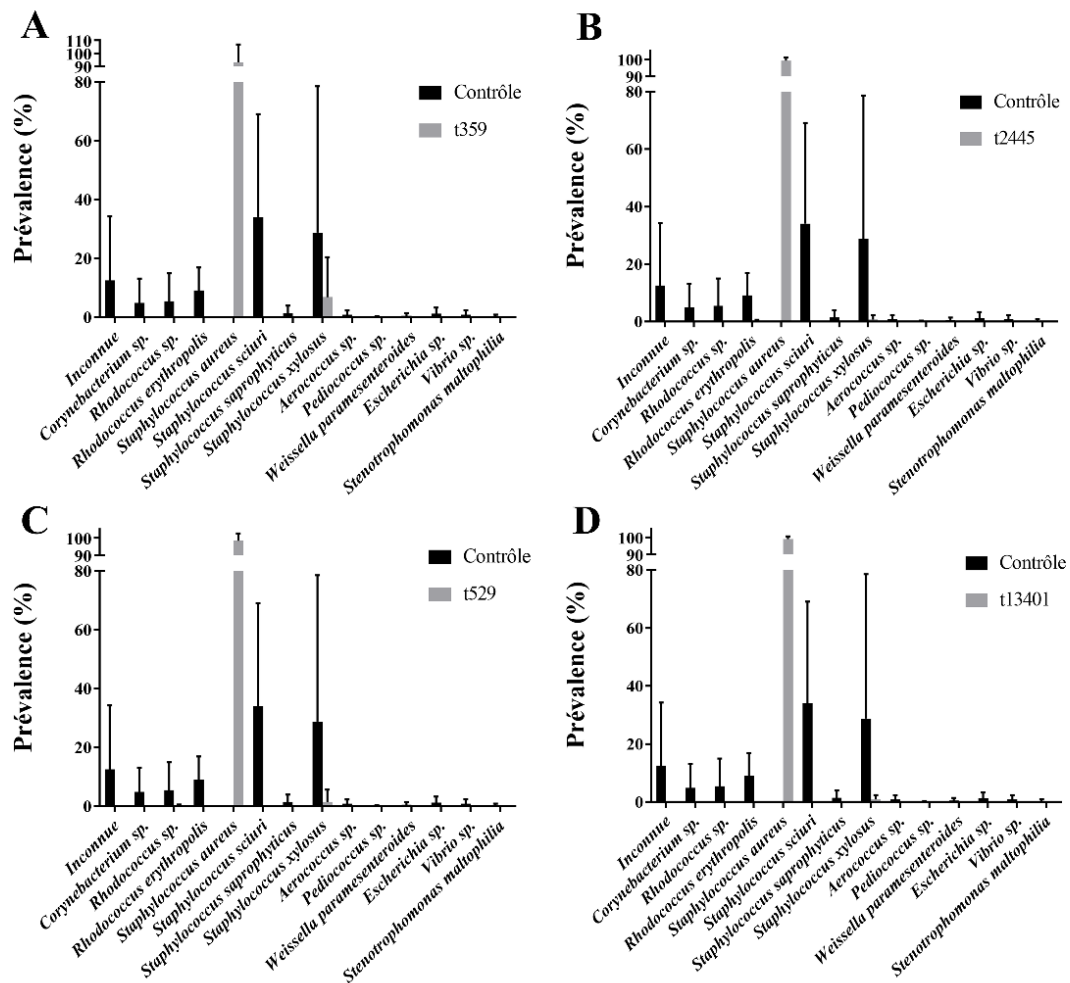
Les résultats de séquençage donnent peu de genres et d'espèces, soit 13 espèces au total, certaines n'étant identifiées qu'au niveau de leur genre (Figure 18). Les témoins démontrent très peu de diversité comparée au lait de la vache 2 analysé dans la partie 1 de ce projet. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation du PMA, qui permet un séquençage des bactéries intactes seulement. Comme nous voulions voir l'effet (antagonisme ou coopération) des souches de *S. aureus* sur les bactéries vivantes du microbiote du lait, il était crucial de ne détecter que celles-ci. Puisque nous n'avons pas utilisé de protecteur pour protéger les communautés bactériennes de nos laits avant l'utilisation, ceci peut expliquer les espèces qui ont été retrouvées dans la partie 1 du projet mais pas dans cette partie. Certains genres et espèces aperçus ici ne sont pas ou peu retrouvés dans la première partie, comme *Rhodococcus*, *Pediococcus*, *Vibrio* et *Stenotrophomonas*. Les genres *Aerococcus* et *Corynebacterium* sont aussi présents dans les témoins, ainsi que certaines espèces de *Staphylococcus* retrouvés aussi dans la première partie du projet.



**Figure 18 : Prévalence des espèces/genres retrouvés dans les laits témoins (sans inoculation avec *S. aureus*) après 6 heures de croissance.**

Pour les types spa t267, t451 et t605, 100 % des séquences obtenues sont alignées sur le génome de *S. aureus*. Pour les autres types spa, quelques espèces sont aussi présentes suite à l'incubation, principalement *S. sciuri* et *S. xylosus* (Figure 19).





**Figure 19 :** Graphique montrant la prévalence de tous les espèces/genres obtenus chez les témoins et chez les laits inoculés par les souches des types *spa*.

Types *spa* (A) t359, (B) t2445, (C) t529 et (D) t13401.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet avait pour but d'approfondir les connaissances liées à la virulence de *S. aureus* en observant son impact sur son environnement bactérien immédiat dans la glande mammaire bovine. Dans un second temps, l'impact de ce microbiote sur *S. aureus* a aussi été analysé. Via l'utilisation du séquençage de masse, nous avons pu explorer le transcriptome de *S. aureus* ainsi que les communautés bactériennes retrouvées dans les différents laits échantillonnés. Nous avons donc pu établir qu'il existait, à l'intérieur du même animal, des différences majeures entre le microbiote retrouvé dans un quartier à faible prévalence de *S. aureus* et un à forte prévalence de *S. aureus* dans un contexte de mammite bovine. Nous avons aussi observé quelques modifications au niveau de l'expression génétique d'une souche de référence, *S. aureus* Newbould, lorsque celle-ci était en croissance dans du lait avec différentes compositions bactériennes. D'un autre côté, il n'a pas été possible d'établir avec précision les espèces qui étaient affectées par l'introduction de différentes souches de *S. aureus*. Cette étude a permis de mieux comprendre les mécanismes de dysbioses induits par la prévalence élevée de *S. aureus* dans le lait de vache ainsi que d'observer la transcriptomique de cette bactérie dans différents types de laits.

Le microbiote du lait de vache, comme beaucoup d'autres, joue aussi un rôle contre la colonisation de microorganismes pathogènes. De multiples études ont d'ailleurs démontré que

plusieurs espèces régulièrement retrouvées sur le trayon et/ou dans le lait ont un effet inhibiteur contre des agents pathogènes majeurs de la mammite, incluant *S. aureus* (De Vliegher *et al.*, 2004; Fragkou *et al.*, 2007). Le but de la première partie de cette étude était de mieux comprendre comment la prévalence de *S. aureus* affecte le microbiote du lait cru à l'intérieur du même animal, et de voir si certaines espèces considérées comme étant protectrices sont affectées par sa présence. De façon intéressante, des motifs de diminution de la présence de certains genres/espèces, se répétaient dans plusieurs, sinon toutes les vaches.

Grâce aux statistiques calculées par le pipeline QIIME2, nous avons observé une diminution significative de l'indice de diversité de Shannon ainsi que de l'indice de richesse de Chao1 dans le lait SA + (Figure 4). L'indice de diversité de Shannon est calculé en fonction de la richesse et de l'uniformité, et donc le nombre de séquence associé à chaque individu, et l'uniformité de cette répartition (Zand, 1976). L'indice de richesse Chao1 de son côté représente un calcul de la richesse minimale d'un échantillon via une extrapolation sur les OTUs potentiels qui auraient pu être alignés (Chao, 1984). Une diversité moins élevée indique souvent un microbiote instable, beaucoup plus prompt à l'installation d'un agent pathogène ou étant déjà sous l'assaut d'un agent pathogène. À l'inverse, un microbiote diversifié est signe de stabilité et est souvent moins affecté par l'introduction d'une bactérie pathogène (Huttenhower *et al.*, 2012; Peterson *et al.*, 2015). Ceci s'explique entre autres par la réduction du nombre de niches disponibles pour des bactéries pathogènes mais aussi par la présence d'une ou de plusieurs espèces antagonistes à celles-ci.

La vache 6 démontrait un écart encore plus grand pour ces deux indices, soit un  $p$  de 0,002 pour l'index de Shannon et de 0,012 pour l'index de Chao1. Cette vache est aussi la vache présentant le CCS total le plus élevé, soit un peu plus de 5 millions, comparé à la moyenne de

154 000 cellules/ml pour les 3 autres vaches. Cette tendance a aussi été retrouvée par l'équipe d'Oikonomou en observant les différences entre un microbiote provenant du lait de vache saine avec des CCS inférieure à 400 000 cellules/ml et en le comparant au microbiote provenant de lait de vaches atteintes d'une mammite avec un CCS supérieure à 400 000 cellules/ml. L'indice de Shannon était significativement plus bas chez les vaches ayant un CCS supérieure à 400 000 cellules/ml (Oikonomou *et al.*, 2014). Dans leur cas, les espèces obtenues démontraient plus de variation, ce qui amenait à la question de l'influence des cellules somatiques sur la composition du microbiote. Est-ce qu'une flambée de cellules somatiques amène à des dommages collatéraux aux membres du microbiote de base, affectant ainsi la diversité, ou est-ce simplement la prévalence plus élevée d'une bactérie pathogène qui vient changer l'indice de diversité? Dans les cas de la vache 6, la prévalence élevée de *S. aureus* dans le lait SA +, soit une moyenne d'environ 89 % comparée à une moyenne d'environ 2 % pour le lait SA -, est probablement la cause de l'indice de diversité observé. On peut donc émettre l'hypothèse que dans notre cas, les baisses de diversité et de richesse sont liées à une augmentation de la prévalence de *S. aureus*.

Cette augmentation dans la prévalence a aussi un effet sur d'autres communautés bactériennes retrouvées dans nos laits. Statistiquement, cela a été démontré grâce à l'analyse de dissimilarité de Bray-Curtis (Figure 5). L'espacement entre chaque point représente les différences au niveau de la composition bactérienne du microbiote. Dans le cas de notre expérience, plus la prévalence de *S. aureus* est élevée, plus cet espacement est grand, suggérant que les communautés bactériennes sont modifiées par la présence de cette espèce.

La composition bactérienne des échantillons est originale puisque, même si les phyla retrouvés sont communs à d'autres études sur le microbiote du lait cru, la présence des *Firmicutes* est

anormalement élevée (Figure 6). Ceci peut être considéré comme étant normal chez des microbiotes largement composés de *S. aureus*, mais ce n'est pas le cas pour tous les échantillons. Pour cette étude, la prévalence élevée de *Firmicutes* est surtout expliquée par la présence de plusieurs genres de ce phylum dont *Aerococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Anaerococcus* et des membres de la famille des *Ruminococcaceae* qui font partie des 20 genres les plus prévalents (Figure 7). De plus, dans le genre *Staphylococcus*, on a retrouvé 11 espèces autres que *S. aureus* qui sont souvent abondantes. De son côté, la baisse de prévalence pour le phylum des *Actinobactéries* est majoritairement dû à la chute de prévalence du genre *Corynebacterium* qui, aux côtés du genre *Aerococcus*, est significativement moins prévalent dans les échantillons SA + (Figure 7). Quatre des 20 genres les plus prévalents, soit *Staphylococcus*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* et des genres de la famille des *Ruminococcaceae*, sont plus abondants dans le lait SA +. Bien que *Staphylococcus* et *Pseudomonas* soient des bactéries pathogènes connues, il ne faut pas mettre de côté *Ralstonia* qui est considéré comme une espèce aérotolérante opportuniste (Ryan et Adley, 2014). Ce genre a été retrouvé dans plusieurs études sur le microbiote du lait, incluant une étude où sa prévalence était plus élevée dans les quartiers sains de vaches atteintes de la mammite (Delbès *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2011; Kuehn *et al.*, 2013). Cependant, une étude menée en 2014 a révélé que *Ralstonia* était l'un des contaminants régulièrement retrouvés après l'extraction de l'ADN avec des trousse commerciales (Salter *et al.*, 2014). Bien que la trousse PowerFood de Qiagen ne figure pas dans la liste des trousse testées, il est possible que la présence de ce genre soit liée à la contamination des solutions de la trousse.

Des 43 genres retrouvés, 28 sont communs aux deux conditions. Deux genres ne sont retrouvés que dans les échantillons SA +, soit *Lysinibacillus* et *Methylobacterium*, qui sont sous 1 % de prévalence. Treize genres sont uniques aux échantillons SA –, dont certains ont aussi été retrouvés dans d'autres études comme *Streptococcus* et les genres de la famille *Lachnospiraceae* (Quigley *et al.*, 2013; Oikonomou *et al.*, 2012 et 2014). Ces 13 genres sont

propres aux échantillons à faible prévalence de *S. aureus* seulement, et du coup, leur disparition complète dans les échantillons à forte prévalence de *S. aureus*, indiquent qu'il existe probablement une dysbiose à l'intérieure du lait SA +.

*Corynebacterium*, l'un des genres significativement moins abondants dans le lait SA +, et *S. aureus* entretiennent une relation d'antagonisme, ce qui pourrait expliquer sa diminution. Tel que décrit dans l'introduction, *Corynebacterium* et *S. aureus* entrent en compétition pour les mêmes sites d'adhésion épithéliales et *S. aureus* produit aussi plusieurs bactériocines qui nuisent à *Corynebacterium*, comme Bac1829, l'auréocine A70, l'auréocine A53 et la staphylococcine 188 (Crupper et Iandolo, 1996; dos Santos *et al.*, 2002; Lina *et al.*, 2003; Saeed *et al.*, 2004). *C. striatum*, une espèce de *Corynebacterium*, a même démontré qu'elle modifiait le phénotype de *S. aureus* d'un phénotype virulent à un phénotype commensal (Ramsey *et al.*, 2016). Puisque *Corynebacterium* semblait, du moins dans notre étude, faire partie du microbiote type du lait de vache, il pourrait être intéressant de voir si l'utilisation de *C. striatum* comme probiotique intramammaire a un effet sur la colonisation et la virulence de *S. aureus*.

Le genre *Weissella*, bien qu'il soit significativement moins abondant que dans le quartier SA + de la vache 2, est aussi un genre intéressant au niveau de son potentiel en tant que probiotique. Plusieurs espèces démontrent un potentiel intéressant, comme *W. kimchii*, un producteur de peroxyde qui pourrait être utilisé dans la prévention d'infections vaginales causées par *C. albicans*, *E. coli* et *S. aureus*, ou bien *W. paramesenteroides* qui produit un composé non-protéique antibactérien à large spectre (Lee, 2005; Pal et Ramana, 2010; Abriouel *et al.*, 2015). De plus, une étude menée en 2017 a démontré qu'une protéine de liaison à la fibronectine produite par *W. cibaria* inhibait la colonisation des glandes mammaires par *S. aureus* (Wang

*et al.*, 2017). Comme *Corynebacterium*, *Weissella* semblait faire partie du microbiote type de notre étude, il pourrait donc être intéressant de voir l'effet de *W. cibaria* comme probiotique dans la prévention de la mammite bovine.

De son côté, le genre *Aerococcus* est possiblement un contaminant. Lors d'une étude menée sur 16 fermes françaises, le genre a été retrouvé à la fois dans la poussière et dans le lait, suggérant une possible contamination (Vacheyrou *et al.*, 2011). La famille *Aerococcaceae* est aussi retrouvée dans le lait d'autres ruminants, comme les buffles d'eau où sont abondance diminue dans les quartiers atteints de la mammite (Catozzi *et al.*, 2017).

De ces analyses, il était intéressant d'observer la prévalence d'espèces du genre *Staphylococcus*. Certaines espèces étaient peu présentes, comme *S. kloosii* qui a une prévalence sous 1 % et *S. succinus*, *S. epidermidis* et *S. equorum* qui sont sous 5 %. Puis, certaines espèces comme *S. simulans* et *S. equorum* étaient spécifiques qu'à un quartier d'un animal. D'autres espèces étaient particulièrement abondantes, comme *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. arlettae*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. auricularis* et, tel qu'attendu, *S. aureus*. Hormis *S. aureus*, ces espèces sont toutes coagulase-négatives (CNS), un groupe qui peut prendre plusieurs rôles dans la mammite bovine. En moyenne, 15 % des vaches d'un troupeau sont positives pour la présence d'espèces CNS dans leur lait et notre étude a permis d'identifier 3 des CNS les plus fréquemment identifiés dans des cas de mammites, soit *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. xylosus* (Schukken *et al.*, 2009; Vanderhaeghen *et al.*, 2014). D'un côté, selon certaines études, les espèces CNS sont considérées à tort comme des bactéries pathogènes mineures de la mammite bovine, tandis que d'autres études démontrent un rôle protecteur des CNS contre l'infection par des espèces pathogènes majeures et même parfois une augmentation de la production laitière chez des vaches positives pour des CNS (De Vliegher *et al.*, 2004; Taponen *et al.*, 2006;

Braem *et al.*, 2014; Piccart *et al.*, 2015). La souche CNS démontrant une activité inhibitrice est principalement *S. chromogenes*, qui n'a pas été retrouvée dans nos échantillons. Cependant, d'autres souches CNS retrouvées dans notre étude démontraient des activités inhibitrices. Par exemple, *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. simulans* et *S. arlettae* démontraient des activités antibactériennes contre des espèces pathogènes majeures de la mammite, incluant *S. aureus* (dos Santos Nascimento *et al.*, 2005; Braem *et al.*, 2014). Seules les souches *S. auricularis*, *S. kloosii*, *S. succinus* et *S. xylosus* retrouvées dans notre étude ne démontraient aucune activité inhibitrice.

Certaines de ces espèces proviennent de l'environnement de l'animal, comme *S. equorum* et *S. sciuri* (Visscher *et al.*, 2014). Ces deux espèces, ainsi que *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. auricularis* et *S. xylosus*, ont aussi été retrouvées sur le trayon des vaches échantillonnées dans certaines études (Devriese et De Keyser, 1980; Piessens *et al.*, 2011; de Freitas *et al.*, 2013; Visscher *et al.*, 2014). Une partie de cette colonisation de la peau peut être expliquée par la présence de *S. sciuri* et de *S. simulans* dans certaines litières à base de sciure de bois (Piessens *et al.*, 2011). L'abondance de ces espèces dans l'environnement et le microbiote du trayon et du lait, ainsi que leurs capacités d'inhibition, démontre que les CNS ont probablement un rôle important dans la stabilité des communautés bactériennes du lait.

L'analyse de l'influence de l'abondance de *S. aureus* sur l'abondance des CNS démontre d'abord qu'à partir d'une prévalence supérieure à 80 %, la plupart des CNS disparaissent hormis *S. arlettae* et *S. sciuri*. Puis, en tentant d'établir une corrélation entre ces espèces et *S. aureus*, *S. hominis* est le CNS qui ressort le plus : plus l'abondance de *S. aureus* augmente, plus celle de *S. hominis* diminue. À l'inverse, *S. xylosus* semble augmenter, jusqu'à disparaître lorsque la prévalence de *S. aureus* est supérieure à 80 %. *S. sciuri* et *S. saprophyticus*



démontrent une plus grande prévalence lorsque l'abondance de *S. aureus* est entre 1 et 5 %, tandis que la prévalence de *S. arlettae* est plutôt stable jusqu'à 80 %. Un autre résultat anormal est l'abondance élevée, soit environ 64 %, de l'espèce *S. simulans* isolée seulement du lait SA – de la vache 4. Il est alors logique de se questionner sur l'état de santé de ce quartier : était-il vraiment sain? Pouvait-il être atteint d'une mammite causée par *S. simulans*, l'un des 5 CNS les plus fréquemment isolés de cas de mammites (Vanderhaeghen *et al.*, 2014)? Cette forte prévalence pourrait expliquer pourquoi la vache 4 est la seule vache ne démontrant aucun genre significativement plus/moins abondant dans son quartier SA +, puisque la diversité de son quartier SA – est aussi affectée.

Les résultats obtenus pour cette partie du projet suggèrent qu'il existe une différence au niveau des communautés bactériennes du lait à forte abondance de *S. aureus* lorsqu'il est comparé à celles d'un lait à faible prévalence de *S. aureus*, et ce, même à l'intérieur de la même vache. Les indices de Shannon et de Chao1 sont tous les deux significativement plus bas pour les laits SA +, démontrant une baisse dans la diversité et la richesse des séquences. Les genres significativement affectés par l'augmentation de l'abondance de *S. aureus* sont *Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Aerococcus*. Nous avons aussi observé une grande diversité des espèces CNS, suggérant leur forte prévalence dans ce troupeau.

Cette première partie du projet nous a donné les bases pour l'analyse en transcriptomique des gènes exprimés par SANB. En ayant en tête l'abondance des communautés bactériennes des laits étudiés, l'étude différentielle de l'expression des gènes exprimés prend une dimension supplémentaire.

Tel que mentionné dans la section des résultats, lorsque l'expression de SANB en croissance dans les différents laits était comparée à son expression en croissance dans le bouillon TS, seule la branche métabolique du traitement des informations environnementales était en moyenne plus exprimée. Dans les gènes plus exprimés de cette branche, le gène codant pour la protéine EssB était particulièrement intéressant. Cette protéine fait partie d'un système de sécrétion de type VII, soit le système de sécrétion homologue à ESAT-6, nécessaire à la sécrétion de EsxA et EsxB (Chen *et al.*, 2012). Ces deux protéines Esx sont liées à la virulence intracellulaire de *S. aureus* : EsxA interfère avec la voie métabolique de l'apoptose chez les cellules hôtes, et EsxB est nécessaire au relâchement de la bactérie une fois l'apoptose enclenchée (Balsamo *et al.*, 2014). Le gène codant pour cette protéine est 34 et 68 fois plus exprimé dans le lait SA – et SA + respectivement, et ce de façon significative, par rapport à leur expression dans le bouillon TS. Cela suggère que le lait puisse activer une voie métabolique liée à l'internalisation cellulaire chez *S. aureus*. Puis, comme en comparaison ce gène est 2 fois plus exprimé lorsque la souche est en contact avec le lait SA +, on peut aussi supposer que l'abondance d'une population de *S. aureus* déjà présente puisse encourager l'expression de ce gène lié à la virulence.

En observant plutôt la branche du traitement des informations génétiques, quelques motifs récurrents fournissent des informations supplémentaires. De façon intéressante, les gènes codant pour des protéines de réponse au stress sont majoritairement moins exprimés en croissance dans les laits SA + et SA – en comparaison avec le bouillon TS. Ceci suggère peut-être que le bouillon TS, en étant un milieu de croissance nutritif, permet une croissance plus rapide de *S. aureus*. En atteignant une densité cellulaire élevée plus rapidement les gènes liés à la réponse au stress sont alors exprimés. Puis, suivant la même tendance, des gènes liés à la division cellulaire et à la production de protéines ribosomales sont aussi moins exprimés en croissance dans les laits, suggérant une croissance ralentie. Ce résultat est étonnant, puisque le lait constitue un milieu de croissance idéal pour *S. aureus*. Le phénomène aurait pu être

expliqué par la saturation du milieu après 6 heures de culture, lorsque le décompte montrait environ  $10^8$  UFC/ml, mais il aurait donc dû être aussi observé dans les témoins de croissance dans le bouillon TS. Peut-être s'agit-il alors d'une influence des bactéries déjà présentes dans le lait, soit *S. aureus*, soit d'autres, qui imposent un ralentissement sur la croissance de la souche de référence. De cette branche, le gène *codY* est particulièrement intéressant. Il s'agit d'un répresseur de transcription qui vise les gènes de virulence. Il empêche la production des hémolysines  $\alpha$  et  $\delta$  et réprime des protéines liées à la régulation du système *agr*, une voie cruciale dans la virulence de *S. aureus* (Majerczyk *et al.*, 2008; Painter *et al.*, 2014). Comme celui-ci est moins exprimé par SANB lorsqu'il est en croissance dans les laits SA + et SA -, cela suggère qu'il y a une activation de facteurs de virulence qui est présente dans le lait et non pas dans le bouillon TS.

De la branche du métabolisme général, l'expression suit la même tendance, c'est-à-dire qu'il y a une réduction de l'expression des gènes de la plupart des sous-branches, hormis pour les gènes codant pour des peptidases, et les gènes codant pour des protéines liées au métabolisme des nucléotides et des protéines liées à de multiples voies. Parmi les peptidases qui sont significativement plus exprimés, il y a une métalloprotéinase auréolysine codée par le gène *aur*. Cette enzyme est reconnue comme un inhibiteur du système du complément, en plus d'empêcher la phagocytose de *S. aureus* par les neutrophiles (Laarman *et al.*, 2011). Un autre gène intéressant, soit le gène codant pour la staphopain A, est aussi significativement plus exprimé par SANB en croissance dans les laits. Ce gène est régulièrement co-exprimé avec l'auréolysine, en plus d'être régulé positivement par le système *agr* (Oscarsson *et al.*, 2006). L'enzyme joue un rôle dans l'inhibition du système du complément, et a la capacité de bloquer les récepteurs de chimiokine. Ceci mène donc au blocage de l'activation des neutrophiles par les chimiokines de type CXCR2 en plus d'inhiber leur migration vers ces dites chimiokines (Laarman *et al.*, 2012). De plus, il est intéressant de voir qu'ils sont deux à trois fois plus exprimés dans le lait SA -. La staphopain A est 48 et 190 fois plus exprimé dans le lait SA +

et SA – respectivement, tandis que l’auréolysine est 28 et 55 fois plus exprimé dans le lait SA + et SA – respectivement, et de façon significative, par rapport à leur expression dans le bouillon TS.

En analysant la branche des processus cellulaires, quelques gènes intéressants ressortent aussi, tel que les gènes codant pour la diguanylate cyclase et pour le précurseur de l’hémolysine  $\alpha$ . L’enzyme diguanylate cyclase aide la formation du biofilm bactérien en activant les enzymes de synthèse des exopolysaccharides (D’Argenio et Miller, 2004). Cependant, même si la diguanylate cyclase est impliquée, il ne semble pas que cette régulation du biofilm passe par la synthèse de c-di-GMP chez *S. aureus* (Holland *et al.*, 2008; Shang *et al.*, 2009). Comme ce gène est 6 et 7 fois plus exprimé dans les laits SA + et SA – respectivement, cela suggère que la production du biofilm est favorisée par le lait de vache.

Puis, il y a une augmentation des transcrits codant pour un précurseur de l’hémolysine  $\alpha$ , un facteur de virulence majeur chez *S. aureus*. Des expériences ont démontré, grâce à des mutants *hla* ne produisant pas la toxine, que la virulence de *S. aureus* était réduite dans les modèles de pneumonies, d’infections de la peau et de la cornée, de septicémie, de péritonite, du système nerveux centrale, de l’endocardium et finalement, de la glande mammaire, ce qui illustre bien l’étendue de l’utilité de l’hémolysine  $\alpha$  (Patel *et al.*, 1987; Bramley *et al.*, 1989; O’Callaghan *et al.*, 1997; Kielian *et al.*, 2001; Wardenburg *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2010; Powers *et al.*, 2012). Cette toxine forme des pores à la surface de certaines cellules hôtes, ce qui mène à leur apoptose ainsi qu’à des dérèglements au niveau des épithéliums (Bhakdi et Tranum-Jensen, 1991). Ce n’est pas la seule façon que cette toxine peut causer l’apoptose : celle-ci peut interagir avec la machinerie cellulaire de l’apoptose en activant les caspases, ce qui mène au relâchement de cytochrome c (Bantel *et al.*, 2001). De plus, lorsque la toxine est sécrétée à des

concentrations qui ne sont pas lytiques, elle cause d'autres problèmes comme des bouleversements au niveau des voies de signalisation liées à la prolifération cellulaire, des réponses inflammatoires, de la sécrétion de cytokines et des interactions cellulaires (Haugwitz *et al.*, 2006; Berubé *et al.*, 2013). Cette toxine était 19 fois plus exprimée dans le lait SA – que dans le bouillon TS, mais il n'y avait pas de différence significative dans l'expression en croissance dans le lait SA +.

Maintenant que les différences de la transcriptomique de SANB entre une culture avec des laits SA + et SA – versus une culture dans du bouillon TS ont été étudiées, nous passons aux différences observées entre des cultures de SANB dans les laits SA + et des cultures de SANB dans les laits SA –. En étudiant l'ensemble des différences, soit tous les résultats des cocultures dans le lait SA + versus tous les résultats des cultures de SANB dans le lait SA –, seulement six gènes sont exprimés de façon significativement différente. De ces six, quatre sont de la branche du métabolisme général, dont deux du métabolisme des glucides, un de la branche des traitements des informations environnementales et le dernier de la branche des processus cellulaires. De ces gènes, aucun ne semble relié de près à des facteurs de virulence. Via l'augmentation des transcrits de *hemH*, nous pouvons suggérer qu'il y a une production plus accrue d'hème chez SANB en croissance dans le lait SA +, c'est-à-dire un coenzyme essentiel pour la chaîne respiratoire (Hobbs *et al.*, 2017).

La seconde analyse a été faite sur chaque vache, en comparant le transcriptome de la souche de référence en croissance dans le lait SA + versus son transcriptome en croissance dans le lait SA –. Chez la vache 2, trois des quatre gènes exprimés de façon significativement différente dans le lait SA + en comparaison avec leur expression dans le lait SA – n'étaient pas identifiés. Le dernier gène, qui est environ 13 fois moins exprimé par SANB en croissance dans le lait

SA +, est un gène codant pour la GTPase YchF qui lie les deux sous-unités ribosomales. La transcriptomique de SANB dans les laits de la vache 3 a donné 36 gènes exprimés de façon significativement différente, 29 qui étaient significativement plus exprimés et 7 significativement moins exprimés par SANB en croissance dans le lait SA + versus SANB en croissance dans le lait SA -. Plusieurs de ces gènes sont particulièrement intéressants, dont trois gènes liés à des facteurs de virulence. L'un de ces gènes, *hlga*, qui code pour une hémolysine quasi identique à l'hémolysine  $\alpha$  (Cooney *et al.*, 1993), était 280 fois plus exprimée lorsque SANB était en croissance dans le lait SA +. C'est une exotoxine à deux composantes qui peut être produite à partir de six combinaisons différentes, dont l'une inclut une leukocidine (Dinges *et al.*, 2000). Elle est extrêmement cytotoxique et détruit les neutrophiles humains à une concentration de 10 ng/ml, en plus de promouvoir la croissance bactérienne et l'inflammation, tel qu'observé dans un modèle d'endophtalmie chez le lapin (Supersac *et al.*, 1998; DuMont *et al.*, 2011). Étonnamment, il semblerait que l'hémolysine  $\gamma$  ne soit pas régulièrement retrouvée dans les cas de mammites bovines, même si une étude a démontré que le locus *hlgABC* serait à l'origine d'une combinaison adaptée à la colonisation chez le bovin laitier (Fueyo *et al.*, 2005; Moraveji *et al.*, 2014). De façon non-significative, ce gène est plus exprimé dans le lait SA + de la vache 6, mais moins exprimé dans le lait SA + de la vache 2 et 4.

Un autre gène intéressant est 180 fois plus exprimé par SANB dans le lait SA + de la vache 3, mais son identité n'est pas connue. Il s'agit d'une protéine de l'îlot de pathogénicité bovin situé sur le cadre de lecture 17. Ce gène est aussi plus exprimé par SANB en croissance dans le lait SA + des vaches 4 et 6, mais de façon non-significative. Puis, un gène codant pour une protéine de liaison à la fibronectine est 53 fois plus exprimé dans le lait SA + de la vache 3. Tel que mentionné dans l'introduction, les protéines d'adhésion à la fibronectine sont nécessaires à l'attachement de *S. aureus* à l'intérieur de la glande mammaire, ce qui est une étape importante du processus infectieux (Lammers *et al.*, 1999; Brouillette *et al.*, 2003; Ofek *et al.*, 2003). Ces

protéines jouent aussi un rôle dans la formation de caillots bactériens et dans l'internalisation de la bactérie dans les cellules hôtes (Finlay et Falcow, 1997; Ozeri *et al.*, 1998). Globalement, plusieurs gènes liés aux protéines de liaison à la fibronectine sont exprimés de façon différentielle. En considérant la moyenne, l'expression de gènes codant pour des protéines de liaison à la fibronectine sont environ 52 et 34 fois plus exprimés dans le lait SA + des vaches 2 et 3 respectivement, tandis que cette moyenne passe à 4 et -30 fois dans le lait SA + des vaches 4 et 6. Il est intéressant de voir que cette protéine de liaison est souvent plus exprimée lorsque SANB est en croissance dans le lait SA +, suggérant qu'il existe peut-être un lien avec des molécules de *quorum sensing* déjà présentes dans le lait. En fait, les gènes *fnbA* et *clfA*, codant pour une protéine de liaison à la fibronectine et le facteur d'agglutination A, sont tous les deux sous le contrôle directe ou indirecte du régulateur sigma B ( $\sigma^B$ ) (Entenza *et al.*, 2005). Cependant, les résultats ne démontrent aucune augmentation ou diminution significative des gènes liés à ce régulateur.

D'autres gènes intéressants, ne faisant pas partie du processus d'infection, sont aussi exprimés différemment. Par exemple, *luxS* est 14 fois plus exprimé par SANB dans le lait SA + de la vache 3. Quoique *luxS* ne soit pas lié au processus infectieux, des mutants ne portant pas ce gène démontrent une capacité réduite à rivaliser pour la croissance (Doherty *et al.*, 2006). Le gène *lytS*, qui code en partie pour un système de régulation à deux composantes, est environ 40 fois moins exprimé par SANB en croissance dans le lait SA +. Ce système de régulation influence l'expression de l'opéron *lrgAB*, qui code un produit important dans le relâchement d'ADN lors de la formation du biofilm (Sharma-Kuinkel *et al.*, 2009). Cette diminution d'expression est observée dans le lait SA + de toutes les autres vaches, mais de façon non-significative. Finalement, un gène lié à l'accumulation de fer est significativement moins exprimé par SANB en croissance dans le lait SA + de la vache 3, soit *sfaD* codant pour la staphyloferrine A synthase participant à la biosynthèse de ce sidérophore. Exprimé de façon

similaire, *hemC*, est un gène important dans la production d'hème pour la chaîne respiratoire (Lobo *et al.*, 2015).

La croissance de SANB dans le lait SA + de la vache 4 ne démontrait pas de différence d'expression significative dans des gènes de virulence ou lié au processus infectieux. De façon non-significative, le gène *hlgC* codant pour la sous-unité C de l'hémolysine  $\gamma$  est environ 233 fois moins exprimé par SANB en croissance dans le lait SA +. En moyenne, les gènes codant pour des hémolysines étaient moins exprimés par SANB dans le lait SA + de cette vache, contrairement à l'expression de ces gènes dans le lait SA + des autres vaches. C'est que pour les gènes *hlgA*, *hlgC* et *hla*, il y a non seulement peu d'expression dans le lait SA +, il y a aussi en moyenne plus d'expression de ces gènes dans le lait SA – comparativement à l'expression de ces gènes dans les autres laits SA –. Le lait SA – de la vache 4 est aussi le lait contenant une prévalence importante, soit environ 64 %, de *S. simulans*, ce qui pourrait expliquer un décalage dans l'expression de ces gènes. À l'inverse, l'expression de gènes liés à des protéines de liaison au fibrinogène est en moyenne plus grande par SANB en croissance dans le lait SA + de la vache 4 en comparaison avec leur expression dans le lait SA + de d'autres vaches.

Chez la vache 6, il y a une augmentation impressionnante de l'expression du gène *cps2H*, codant pour une protéine de synthèse de la capsule, par SANB dans le lait SA +, qui est  $1,6 \times 10^6$  fois plus exprimé. *S. aureus* est doté d'une capsule qui est impliquée dans sa virulence ainsi que dans sa dissimulation du système immunitaire, et cette promotion capsulaire peut être liée au fait que le lait de la vache 6 était celui qui montrait le CCS le plus élevé (environ 5 millions de cellules/ml de lait) (O'Riordan et Lee, 2004). Si on observe les gènes liés au processus infectieux, SANB en croissance dans le lait SA + de la vache 6 montrait un niveau d'expression plus bas que dans le lait SA + des autres vaches pour les gènes liés aux leucotoxines, soit en



moyenne une expression 117 fois moins élevée que dans le lait SA -. Inversement, le niveau d'expression de gènes *ica* était plus élevé que dans les autres laits SA +. Les gènes *ica*, codant pour des protéines d'adhésion intracellulaires, sont importants dans l'interaction avec des surfaces abiotiques en plus de la synthèse de la matrice extracellulaire de polysaccharides impliquée dans le biofilm et dans la production d'une couche visqueuse appelée *slime* en anglais (Arciola *et al.*, 2001; Nourbakhsh et Namvar, 2016).

Finalement, la dernière partie de ce projet visait à voir si diverses souches de *S. aureus* ayant des caractéristiques variées avaient un impact différent sur le microbiote du lait d'un quartier sain. Les données obtenues démontrent peu de variété d'espèces bactériennes, que ce soit dans les témoins ou bien dans les laits infectés. Ceci peut être causé par plusieurs choses. Les échantillons de laits ont été congelés rapidement après les prélèvements sans avoir ajouté d'agents de cryoprotection, ce qui aurait pu permettre de mieux protéger l'intégrité du microbiote (Rasolofo *et al.*, 2001). Comme nous utilisons le PMA pour sélectionner l'ADN retrouvé dans des bactéries intactes, la congélation ajoutée à ce facteur a probablement résulté en l'amplification de l'ADN d'un groupe restreint de bactéries, ayant non seulement résisté à la congélation mais aussi à 6 heures d'incubation à 35°C. De plus, il se peut que l'inoculation avec *S. aureus* ait été faite avec une trop forte proportion de CFU, éliminant ainsi les rares groupes bactériens encore intacts. Cette technique mériterait d'être optimisée, puis tentée de nouveau, mais sur du lait frais ou du lait protégé lors de la congélation.

Cependant, quelques conclusions peuvent tout de même être tirées des résultats obtenus. Certains genres clés analysés lors de la première partie du projet sont de nouveau retrouvés dans le témoin, comme *Aerococcus* et *Corynebacterium*, suggérant de nouveau que ces derniers font probablement partie du microbiote type du lait de ces vaches. Des espèces de

*Staphylococcus*, comme *S. sciuri*, *S. saprophyticus* et *S. xylosus*, sont elles aussi retrouvées dans le lait témoin, avec une prévalence accrue de *S. sciuri* et de *S. xylosus* composant plus de 50 % des séquences alignées.

Pour trois des sept types *spa*, soit t267, t451 et t605, *S. aureus* composait 100 % du microbiote après inoculation. Ces types *spa* englobent deux souches particulièrement connues de la mammite bovine, soit *S. aureus* Newbould faisant partie du type t267 et une souche de *S. aureus* résistante à la méticilline, Sa1158c, seule souche pour représenter le type t451.

Pour les types t2445, t359, t529 et t13401, malgré une forte chute dans la prévalence de *S. xylosus*, il restait tout de même quelques séquences. À l'inverse, *S. sciuri*, qui a la même prévalence que *S. xylosus* dans le témoin, disparaît complètement. Pour t2445 et t529, il reste quelques séquences de *Rhodococcus*.

Ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse que les types *spa* t267, t451 et t605 sont plus délétères envers le microbiote du lait que t2445, t529, t359 et t13401. Il ne semble pas non plus y avoir de lien avec la survie de *S. xylosus* et la disparition de *S. sciuri* hormis le fait que *S. sciuri* démontrait une activité antibactérienne contre *Listeria innocua*, tandis que *S. xylosus* ne démontrait aucune activité inhibitrice (Braem *et al.*, 2014). Une étude a récemment démontré que *S. xylosus* avait tendance à affecter l'expression de gènes chez *S. aureus* en réduisant l'expression de gènes liés à la virulence, comme *hla* et des transcrits *agr*. Inversement, *S. sciuri* n'avait aucun effet sur *S. aureus*, ce qui peut expliquer sa disparition (Mahmmod *et al.*, 2018).

Pour conclure, bien que la troisième partie de ce projet n'ait pas pu nous éclairer sur les capacités déstabilisatrices des différents types *spa* envers le microbiote du lait, les deux premières parties du projet nous ont permis d'approfondir notre compréhension des mécanismes de virulence de *S. aureus* en prenant en compte son effet sur les communautés bactériennes du lait. Il est clair, dans un premier temps, que les genres *Aerococcus*, *Corynebacterium* et *Staphylococcus* font partie d'un microbiote type du lait de ces vaches, et qu'il serait intéressant de voir s'il s'agit d'un phénomène général ou plutôt régional et réservé à cette ferme. Dans un second temps, nous avons pu observer une différence marquée dans la composition bactérienne du lait, dans le même animal, entre un quartier SA + et un quartier SA -. De ces différences, les plus significatives sont l'augmentation de la prévalence du genre *Staphylococcus*, et la diminution de la prévalence des genres *Aerococcus* et *Corynebacterium*. Nous avons aussi pu déterminer des oscillations intéressantes au niveau de la transcriptomique d'une souche modèle de *S. aureus* lorsque celle-ci était mise en contact avec différents types de lait, apportant ainsi une perspective supplémentaire sur les dialogues et les relations bactériennes qu'entretient *S. aureus* dans le lait de vache cru. Cette étude fondamentale a donc permis d'éclaircir les interactions entre *S. aureus* et le microbiote du lait de vache cru.

## BIBLIOGRAPHIE

Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B. and Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. BMC Vet Res. 12, 270.

Abriouel, H., Lerma, L.L., Casado Muñoz, M.D.C., Montoro, B.P., Kabisch, J., Pichner, R., Cho, G.S., Neve, H., Fusco, V., Franz, C.M. and Gálvez, A. (2015). The controversial nature of the *Weissella* genus: technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. Front Microbiol. 6, 1197.

Allard, M., Ster, C., Jacob, C. L., Scholl, D., Diarra, M. S., Lacasse, P. and Malouin, F. (2013). The expression of a putative exotoxin and an ABC transporter during bovine intramammary infection contributes to the virulence of *Staphylococcus aureus*. Vet Microbiol. 162, 761-770.

Allore, H. G. and Erb, H. N. (1998). Partial budget of the discounted annual benefit of mastitis control Strategies. J Dairy Sci. 81, 2280-2292.

Almeida, R. A., Matthews, K. R., Cifrian, E., Guidry, A. J. and Oliver, S. P. (1996). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci. 79, 1021-1026.

Anderson, J. C. (1983). Veterinary aspects of staphylococci. *Staphylococci and staphylococcal infections 1*, 193-241.

Anderson, K. L., Lyman, R., Moury, K., Ray, D., Watson, D. W. and Correa, M. T. (2012). Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. *J Dairy Sci.* *95*, 4921-4930.

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E. and Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* *2*, 445-459.

Arciola, C. R., Baldassarri, L. and Montanaro, L. (2001). Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of *Staphylococcal* strains from catheter-associated infections. *J Clin Microbiol.* *39*, 2151-2156.

Arvidson, S. and Tegmark, K. (2001). Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* *291*, 159-170.

Asch, B. B., Kamat, B. R. and Burstein, N. A. (1981). Interactions of normal, dysplastic, and malignant mammary epithelial cells with fibronectin *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* *41*, 2115-2125.

Atalla, H., Gyles, C. and Mallard, B. (2010). Persistence of a *Staphylococcus aureus* small colony variants (*S. aureus* SCV) within bovine mammary epithelial cells. *Vet Microbiol.* *143*, 319-328.

Atalla, H., Gyles, C., & Mallard, B. (2011). *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs) and their role in disease. *Anim Health Res Rev.* 12, 33-45.

Balsamo, G., Pezzicoli, A., Merakou, C., Tavarini, S., Bagnoli, F., Serruto, D. and Unnikrishnan, M. (2014). The staphylococcal Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. *Infect Immun.* IAI-01576.

Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K. and Jänicke, R. U. (2001).  $\alpha$ -Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J Cell Biol.* 155, 637-648.

Bar, D., Gröhn, Y.T., Bennett, G., Gonzalez, R.N., Hertl, J.A., Schulte, H.F., Tauer, L.W., Welcome, F.L. and Schukken, Y.H. (2007). Effect of repeated episodes of generic clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.* 90, 4643-4653.

Bar, D., Tauer, L.W., Bennett, G., Gonzalez, R.N., Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Schulte, H.F., Welcome, F.L. and Gröhn, Y.T. (2008). The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming. *J Dairy Sci.* 91, 2205-2214.

Barkema, H. W., Schukken, Y. H. and Zadoks, R. N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci.* 89, 1877-1895.

Baselga, R., Albizu, I. and Amorena, B. (1994). *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. Vet Microbiol. 39, 195-204.

Beaugerie, L. and Petit, J. C. (2004). Antibiotic-associated diarrhoea. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 18, 337-352.

Beenken, K.E., Mrak, L.N., Griffin, L.M., Zielinska, A.K., Shaw, L.N., Rice, K.C., Horswill, A.R., Bayles, K.W. and Smeltzer, M.S. (2010). Epistatic relationships between sarA and agr in *Staphylococcus aureus* biofilm formation. PloS One 5, e10790.

Berriatua, E., Ziluaga, I., Miguel-Virto, C., Uribarren, P., Juste, R., Laevens, S., Vandamme, P. and Govan, J.R.W. (2001). Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. J Clin Microbiol. 39, 990-994.

Berube, B. J. and Wardenburg, J. B. (2013). *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin: nearly a century of intrigue. Toxins 5, 1140-1166.

Bhakdi, S. and Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Rev. 55, 733-751.

Bhatt, V.D., Ahir, V.B., Koringa, P.G., Jakhesara, S.J., Rank, D.N., Nauriyal, D.S., Kunjadia, A.P. and Joshi, C.G. (2012). Milk microbiome signatures of subclinical mastitis-affected cattle analysed by shotgun sequencing. J Appl Microbiol. 112, 639-650.

Bhutto, A. L., Murray, R. D. and Woldehiwet, Z. (2010). Udder shape and teat-end lesions as potential risk factors for high somatic cell counts and intra-mammary infections in dairy cows. *Vet J.* 183, 63-67.

Biswas, L., Biswas, R., Schlag, M., Bertram, R. and Götz, F. (2009). Small-colony variant selection as a survival strategy for *Staphylococcus aureus* in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 75, 6910-6912.

Blowey, R. W., & Edmondson, P. (2010). Mastitis control in dairy herds. (Royaume-Uni : Farming Press).

Boix-Amorós, A., Collado, M. C. and Mira, A. (2016). Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. *Front Microbiol.* 7, 492.

Bonsaglia, E.C., Gomes, M.S., Canisso, I.F., Zhou, Z., Lima, S.F., Rall, V.L., Oikonomou, G., Bicalho, R.C. and Lima, F.S. (2017). Milk microbiome and bacterial load following dry cow therapy without antibiotics in dairy cows with healthy mammary gland. *Sci Rep.* 7, 8067.

Braem, G., Stijlemans, B., Van Haken, W., De Vlieghe, S., De Vuyst, L. and Leroy, F. (2014). Antibacterial activities of coagulase-negative staphylococci from bovine teat apex skin and their inhibitory effect on mastitis-related pathogens. *J Appl Microbiol.* 116, 1084-1093.



Bramley, A. J. and Dodd, F. H. (1984). Reviews of the progress of dairy science: mastitis control—progress and prospects. *J Dairy Res.* 51, 481-512.

Bramley, A. J., Patel, A. H., O'reilly, M., Foster, R. and Foster, T. J. (1989). Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. *Infect Immun.* 57, 2489-2494.

Brouillette, E., Grondin, G., Shkreta, L., Lacasse, P., & Talbot, B. G. (2003). *In vivo* and *in vitro* demonstration that *Staphylococcus aureus* is an intracellular pathogen in the presence or absence of fibronectin-binding proteins. *Microb Patho.* 35, 159-168.

Brouillette, E., Martinez, A., Boyll, B. J., Allen, N. E. and Malouin, F. (2004). Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 41, 35-41.

Brouillette, E., Talbot, B. G. and Malouin, F. (2003). The fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* may promote mammary gland colonization in a lactating mouse model of mastitis. *Infect Immun.* 71, 2292-2295.

Burian, M., Rautenberg, M., Kohler, T., Fritz, M., Krismer, B., Unger, C. and Goerke, C. (2010). Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *J Infect Dis.* 201, 1414-1421.

Cabrera-Rubio, R., Collado, M. C., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. and Mira, A. (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 96, 544-551.

Capuco, A. V., Paape, M. J., Smith, J. J., and Loeffler, D. A. (1985). *In vitro* effect of bacterial toxins on lactating bovine mammary tissue. J. Dairy Sci. 68, 206.

Catozzi, C., Bonastre, A.S., Francino, O., Lecchi, C., De Carlo, E., Vecchio, D., Martucciello, A., Fraulo, P., Bronzo, V., Cuscó, A. and D'Andreano, S. (2017). The microbiota of water buffalo milk during mastitis. PloS One 12, e0184710.

Cha, E., Hertl, J. A., Schukken, Y. H., Tauer, L. W., Welcome, F. L. and Gröhn, Y. T. (2013). The effect of repeated episodes of bacteria-specific clinical mastitis on mortality and culling in Holstein dairy cows. J Dairy Sci. 96, 4993-5007.

Chang, B.S., San Moon, J., Kang, H.M., Kim, Y.I., Lee, H.K., Kim, J.D., Lee, B.S., Koo, H.C. and Park, Y.H. (2008). Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. Vaccine 26, 2081-2091.

Chao, Anne. (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. Scand J Stat, 265-270.

Charlier, C., Cretenet, M., Even, S. and Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. Int J Food Microbiol. 131, 30-39.

Chen, C., Krishnan, V., Macon, K., Manne, K., Narayana, S. V. and Schneewind, O. (2013). Secreted proteases control autolysin-mediated biofilm growth of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem. jbc-M113.

Chen, H., Jogler, M., Rohde, M., Klenk, H.P., Busse, H.J., Tindall, B.J., Spröer, C. and Overmann, J. (2012). Reclassification and emended description of *Caulobacter leidy* as *Sphingomonas leidy* comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*. Int J Syst Evol Microbiol. 62, 2835-2843.

Chen, Y. H., Anderson, M., Hendrickx, A. P. and Missiakas, D. (2012). Characterization of EssB, a protein required for secretion of ESAT-6 like proteins in *Staphylococcus aureus*. BMC Microbiol. 12, 219.

Christiansson, A., Bertilsson, J. and Svensson, B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. J Dairy Sci. 82, 305-314.

Cifrian, E., Guidry, A. J., Bramley, A. J., Norcross, N. L., Bastida-Corcuera, F. D. and Marquardt, W. W. (1996). Effect of staphylococcal  $\beta$  toxin on the cytotoxicity, proliferation and adherence of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. Vet Microbiol. 48, 187-198.

Cifrian, E., Guidry, A. J., O'Brien, C. N. and Marquardt, W. W. (1995). Effect of alpha-toxin and capsular exopolysaccharide on the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured teat, ductal and secretory mammary epithelial cells. Res Vet Sci. 58, 20-25.

Clark, N. C., Weigel, L. M., Patel, J. B. and Tenover, F. C. (2005). Comparison of Tn1546-like elements in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Michigan and Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemoter.* 49, 470-472.

Cogen, A. L., Yamasaki, K., Sanchez, K. M., Dorschner, R. A., Lai, Y., MacLeod, D. T. and Gallo, R. L. (2010). Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol.* 130, 192-200.

Cole, A. L., Muthukrishnan, G., Chong, C., Beavis, A., Eade, C. R., Wood, M. P., ... & Cole, A. M. (2016). Host innate inflammatory factors and staphylococcal protein A influence the duration of human *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Mucosal Immunol.* 9, 1537.

Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M. and Tiedje, J.M (2008). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141-D145.

Cooney, J., Kienle, Z., Foster, T. J. and O'toole, P. W. (1993). The gamma-hemolysin locus of *Staphylococcus aureus* comprises three linked genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect Immun.* 61, 768-771.

Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P. and Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Syst Appl Microbiol.* 31, 126-140.

Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I. and Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326, 1694-1697.

Crupper, S. S. and Iandolo, J. J. (1996). Purification and partial characterization of a novel antibacterial agent (Bac1829) Produced by *Staphylococcus aureus* KSI1829. *Appl Environ Microbiol.* 62, 3171-3175.

D'Argenio, D. A. and Miller, S. I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150, 2497-2502.

D'Argenio, D. A., Wu, M., Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Déziel, E., Smith, E. E. and Brittnacher, M. (2007). Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.*, 64, 512-533.

Dasgupta, A. P. and Hull, R. R. (1989). Late blowing of Swiss cheese: incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *Australian Journal of Dairy Technology.*

de Freitas Guimarães, F., Nóbrega, D. B., Richini-Pereira, V. B., Marson, P. M., de Figueiredo Pantoja, J. C. and Langoni, H. (2013). Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. *J Dairy Sci.* 96, 2866-2872.

De Giorgi, A., Fabbian, F., Molino, C., Misurati, E., Tiseo, R., Parisi, C., Boari, B. and Manfredini, R. (2017). Pulmonary embolism and internal jugular vein thrombosis as evocative clues of Lemierre's syndrome: a case report and review of the literature. *World J Clin Cases* 5, 112.

Delbès, C., Ali-Mandjee, L. and Montel, M. C. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and-independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl Environ Microbiol.* 73, 1882-1891.

DeLeon, S., Clinton, A., Fowler, H., Everett, J., Horswill, A. R. and Rumbaugh, K. P. (2014). Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* wound model. *Infect Immun.*, IAI-02198.

Desmaures, N., Opportune, W. and Gueguen, M. (1997). *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. *Int Dairy J.* 7, 643-646.

Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M. L. and Relman, D. A. (2008). The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol.* 6, e280.

De Visscher, A., Supré, K., Haesebrouck, F., Zadoks, R.N., Piessens, V., Van Coillie, E., Piepers, S. and De Vliegher, S. (2014). Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. *Vet Microbiol.* 172, 466-474.

De Vliegher, S., Opsomer, G., Vanrolleghem, A., Devriese, L.A., Sampimon, O.C., Sol, J., Barkema, H.W., Haesebrouck, F. and de Kruif, A. (2004). *In vitro* growth inhibition of major mastitis pathogens by *Staphylococcus chromogenes* originating from teat apices of dairy heifers. *Vet Microbiol.* 101, 215-221.

Devriese, L. A. and De Keyser, H. (1980). Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *J Dairy Res.* 47, 155-158.

Dinges, M. M., Orwin, P. M. and Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 13, 16-34.

Dingwell, R.T., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Keefe, G.P., DesCoteaux, L., Kelton, D.F., Lissemore, K.D., Schukken, Y.H., Dick, P. and Bagg, R. (2002). The efficacy of intramammary tilmicosin at drying-off, and other risk factors for the prevention of new intramammary infections during the dry period. *J Dairy Sci.* 85, 3250-3259.

Djabri, B., Bareille, N., Beaudeau, F. and Seegers, H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet Res.* 33, 335-357.

Doherty, N., Holden, M. T., Qazi, S. N., Williams, P. and Winzer, K. (2006). Functional analysis of luxS in *Staphylococcus aureus* reveals a role in metabolism but not quorum sensing. *J Bacteriol.* 188, 2885-2897.

Dohoo, I. R. and Leslie, K. E. (1991). Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev Vet Med.* 10, 225-237.

Dogan, B. and Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl Environ Microbiol.* 69, 130-138.

Donnelly, C. W. (2001). Factors associated with hygienic control and quality of cheeses prepared from raw milk: a review. *Bulletin-International Dairy Federation*, 16-27.

Donnet-Hughes, A., Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I. and Schiffrin, E.J. (2010). Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Prot Nutr Soc.* 69, 407-415.

Dos Santos Nascimento, J., Fagundes, P. C., de Paiva Brito, M. A. V., Dos Santos, K. R. N. and de Freire Bastos, M. D. C. (2005). Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 106, 61-71.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M. and Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70, 564-582.

Driehuis, F. and Elferink, S. O. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet Q.* 22, 212-216.

Drummond, G. B. and Vowler, S. L. (2012). Analysis of variance: variably complex. *Adv Physiol Educ.* 36, 85-88.



Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E. and Schifferli, D. M. (2016). Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. EcoSal Plus 7.

DuMont, A.L., Nygaard, T.K., Watkins, R.L., Smith, A., Kozhaya, L., Kreiswirth, B.N., Shopsin, B., Unutmaz, D., Voyich, J.M. and Torres, V.J. (2011). Characterization of a new cytotoxin that contributes to *Staphylococcus aureus* pathogenesis. Mol Microbiol. 79, 814-825.

Elhaig, M. M. and Selim, A. (2015). Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt. Trop Anim Health Prod. 47, 271-276.

Ellis, K. A., Innocent, G. T., Mihm, M., Cripps, P., McLean, W. G., Howard, C. V. and Grove-White, D. (2007). Dairy cow cleanliness and milk quality on organic and conventional farms in the UK. J Dairy Res. 74, 302-310.

Entenza, J.M., Moreillon, P., Senn, M.M., Kormanec, J., Dunman, P.M., Berger-Bächi, B., Projan, S. and Bischoff, M. (2005). Role of  $\sigma$ B in the expression of *Staphylococcus aureus* cell wall adhesins ClfA and FnbA and contribution to infectivity in a rat model of experimental endocarditis. Infect Immun. 73, 990-998.

Fallgren, C., Utt, M. and Ljungh, Å. (2001). Isolation and characterisation of a 17-kDa staphylococcal heparin-binding protein with broad specificity. J Med Microbiol. 50, 547-557.

Field, C. J. (2005). The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr.* 135, 1-4.

Filkins, L. M., Graber, J. A., Olson, D. G., Dolben, E. L., Lynd, L. R., Bhujju, S. and O'Toole, G. A. (2015). Co-culture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* drives *S. aureus* towards fermentative metabolism and reduced viability in a cystic fibrosis model. *J Bacteriol.* JB-00059.

Finelli, L., Fiore, A., Dhara, R., Brammer, L., Shay, D. K., Kamimoto, L. and Uyeki, T. (2008). Influenza-associated pediatric mortality in the United States: increase of *Staphylococcus aureus* coinfection. *Pediatrics* 122, 805-811.

Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61, 136-169.

Flannagan, S. E., Chow, J. W., Donabedian, S. M., Brown, W. J., Perri, M. B., Zervos, M. J. and Clewell, D. B. (2003). Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. *Antimicrob Agents Chemoter.* 47, 3954-3959.

Food and Drug Administration. (2014). Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals.

Fox, L. K. and Gay, J. M. (1993). Contagious mastitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice* 9, 475-487.

Fox, L. K. and Norell, R. J. (1994). *Staphylococcus aureus* colonization of teat skin as affected by postmilking teat treatment when exposed to cold and windy conditions. J Dairy Sci. 77, 2281-2288.

Fragkou, I. A., Mavrogianni, V. S., Cripps, P. J., Gougoulis, D. A. and Fthenakis, G. C. (2007). The bacterial flora in the teat duct of ewes can protect against and can cause mastitis. Vet Res. 38, 525-545.

Frank, D. N., Feazel, L. M., Bessesen, M. T., Price, C. S., Janoff, E. N., and Pace, N. R. (2010). The human nasal microbiota and *Staphylococcus aureus* carriage. PloS One 5, e10598.

Francoz, D., Bergeron, L., Nadeau, M. and Beauchamp, G. (2012). Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Québec. Can Vet J. 53, 1071.

Freick, M., Frank, Y., Steinert, K., Hamedy, A., Passarge, O. and Sobiraj, A. (2016). Mastitis vaccination using a commercial polyvalent vaccine or a herd-specific *Staphylococcus aureus* vaccine. Tierärztliche Praxis G: Großtiere/Nutztiere 44, 219-229.

Fueyo, J. M., Mendoza, M. C., Rodicio, M. R., Muniz, J., Alvarez, M. A. and Martín, M. C. (2005). Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. J Clin Microbiol. 43, 1278-1284.

Fugère, A., Séguin, D. L., Mitchell, G., Déziel, E., Dekimpe, V., Cantin, A. M. and Malouin, F. (2014). Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. PLoS One 9, e86705.

Ganda, E. K., Gaeta, N., Sipka, A., Pomeroy, B., Oikonomou, G., Schukken, Y. H. and Bicalho, R. C. (2017). Normal milk microbiome is reestablished following experimental infection with *Escherichia coli* independent of intramammary antibiotic treatment with a third-generation cephalosporin in bovines. Microbiome 5, 74.

Gennaris, A., Ezraty, B., Henry, C., Agrebi, R., Vergnes, A., Oheix, E., Bos, J., Leverrier, P., Espinosa, L., Szewczyk, J. and Vertommen, D. (2015). Repairing oxidized proteins in the bacterial envelope using respiratory chain electrons. Nature 528, 409.

Giannechini, R., Concha, C., Rivero, R., Delucci, I. and López, J. M. (2002). Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. Acta Vet Scan. 43, 221.

Giello, M., La Stora, A., Masucci, F., Di Francia, A., Ercolini, D. and Villani, F. (2017). Dynamics of bacterial communities during manufacture and ripening of traditional Caciocavallo of Castelfranco cheese in relation to cows' feeding. Food Microbiol. 63, 170-177.

Gill, J. J., Sabour, P. M., Gong, J., Yu, H., Leslie, K. E. and Griffiths, M. W. (2006). Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. FEMS Microbiol Ecol. 56, 471-481.

Gillespie, B.E., Moorehead, H., Lunn, P., Dowlen, H.H., Johnson, D.L., Lamar, K.C., Lewis, M.J., Ivey, S.J., Hallberg, J.W., Chester, S.T. and Oliver, S.P. (2002). Efficacy of extended pirlimycin hydrochloride therapy for treatment of environmental *Streptococcus* spp and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in lactating dairy cows. *Vet Ther.* 3, 373-380.

Godden, S., Bey, R., Lorch, K., Farnsworth, R. and Rapnicki, P. (2008). Ability of organic and inorganic bedding materials to promote growth of environmental bacteria. *J Dairy Sci.* 91, 151-159.

Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F. and Jacques, M. (2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière: une revue bibliographique.

Götz, F., Bannerman, T. and Schleifer, K. H. (2006). The genera staphylococcus and macrococcus. In *The Prokaryotes*. (New-York : Springer) pp. 5-75

Gudding, R., McDonald, J. S. and Cheville, N. F. (1984). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am J Vet Res.* 45, 2525-2531.

Hallander, H. O., Paniagua, M., Espinoza, F., Askelöf, P., Corrales, E., Ringman, M. and Storsaeter, J. (2002). Calibrated serological techniques demonstrate significant different serum response rates to an oral killed cholera vaccine between Swedish and Nicaraguan children. *Vaccine* 21, 138-145.

Halleron, R. (1997). Liner slips cause 10 to 15 percent of new infections.

Hamill, R. J., Vann, J. M. and Proctor, R. A. (1986). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by cultured bovine aortic endothelial cells: model for postadherence events in endovascular infections. *Infect Immun.* 54, 833-836.

Hantsis-Zacharov, E. and Halpern, M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol.* 73, 7162-7168.

Harriott, M. M. and Noverr, M. C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 3914-3922.

Haugwitz, U., Bobkiewicz, W., Han, S.R., Beckmann, E., Veerachato, G., Shaid, S., Biehl, S., Dersch, K., Bhakdi, S. and Husmann, M. (2006). Pore-forming *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin triggers epidermal growth factor receptor-dependent proliferation. *Cell Microbiol.* 8, 1591-1600.

Haveri, M., Roslöf, A., Rantala, L. and Pyörälä, S. (2007). Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J Appl Microbiol.* 103, 993-1000.

Hays, M. P., Ericsson, A. C., Yang, Y. and Hardwidge, P. R. (2016). Vaccinating with conserved *Escherichia coli* antigens does not alter the mouse intestinal microbiome. *BMC Res Notes* 9, 401.

Hegde, R., Isloor, S., Prabhu, K. N., Shome, B. R., Rathnamma, D., Suryanarayana, V. V. S. and Akhila, D. S. (2013). Incidence of subclinical mastitis and prevalence of major mastitis pathogens in organized farms and unorganized sectors. *Indian J Microbiol.* 53, 315-320.

Hemme, D. and Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int Dairy J* 14, 467-494.

Hertl, J.A., Schukken, Y.H., Bar, D., Bennett, G.J., González, R.N., Rauch, B.J., Welcome, F.L., Tauer, L.W. and Gröhn, Y.T. (2011). The effect of recurrent episodes of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on mortality and culling in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 94, 4863-4877.

Hertl, J. A., Y. T. Gröhn, J. D. G. Leach, D. Bar, G. J. Bennett, R. N. Gonzalez, B. J. Rauch, F. L. Welcome, L. W. Tauer, and Y. H. Schukken. (2010). Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 93, 1551-1560.

Hobbs, C., Reid, J. D. and Shepherd, M. (2017). The coproporphyrin ferrochelatase of *Staphylococcus aureus*: mechanistic insights into a regulatory iron binding site. *Biochem J.* BCJ20170362.

Hogan, J. S., Bogacz, V. L., Thompson, L. M., Romig, S., Schoenberger, P. S., Weiss, W. P. and Smith, K. L. (1999). Bacterial Counts Associated with Sawdust and Recycled Manure Bedding Treated with Commercial Conditioners. *J Dairy Sci.* 82, 1690-1695.

Holland, L.M., O'donnell, S.T., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, L., Slater, S.R., Fey, P.D., Gomelsky, M. and O'Gara, J.P. (2008). A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP. *J Bacteriol.* *190*, 5178-5189.

Holley, J. L., Bernardini, J. and Piraino, B. (1992). Polymicrobial peritonitis in patients on continuous peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis.* *19*, 162-166.

Huda, M.N., Lewis, Z., Kalanetra, K.M., Rashid, M., Ahmad, S.M., Raqib, R., Qadri, F., Underwood, M.A., Mills, D.A. and Stephensen, C.B. (2014). Stool microbiota and vaccine responses of infants. *Pediatrics*.

Hudson, M. C., Ramp, W. K., Nicholson, N. C., Williams, A. S. and Nousiainen, M. T. (1995). Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Microb Pathog.* *19*, 409-419.

Huemer, I. A., Klijn, N., Vogelsang, H. W. and Langeveld, L. P. (1998). Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal* *8*, 851-855.

Hunt, K.M., Foster, J.A., Forney, L.J., Schütte, U.M., Beck, D.L., Abdo, Z., Fox, L.K., Williams, J.E., McGuire, M.K. and McGuire, M.A. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS One* *6*, e21313.



Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J.H., Chinwalla, A.T., Creasy, H.H., Earl, A.M., FitzGerald, M.G., Fulton, R.S. and Giglio, M.G. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486, 207.

Ismail, Z. B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Vet World* 10, 1057.

Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K. and Mizunoe, Y. (2010). *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization. *Nature* 465, 346.

Jain, N. C. (1979). Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *J Dairy Sci.* 62, 128-134.

Jamali, H., Barkema, H.W., Jacques, M., Lavallée-Bourget, E.M., Malouin, F., Saini, V., Stryhn, H. and Dufour, S. (2018). Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. *J Dairy Sci.*

Jamali, H., Radmehr, B. and Ismail, S. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 97, 2226-2230.

Jeurink, P.V., Van Bergenhenegouwen, J., Jimenez, E., Knippels, L.M.J., Fernández, L., Garssen, J., Knol, J., Rodriguez, J.M. and Martin, R. (2012). Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes* 4, 17-30.

Jevon, M., Guo, C., Ma, B., Mordan, N., Nair, S.P., Harris, M., Henderson, B., Bentley, G. and Meghji, S. (1999). Mechanisms of Internalization of *Staphylococcus aureus* by Cultured Human Osteoblasts. *Infect Immun.* 67, 2677-2681.

Jiang, V., Jiang, B., Tate, J., Parashar, U. D. and Patel, M. M. (2010). Performance of rotavirus vaccines in developed and developing countries. *Hum Vaccin.* 6, 532-542.

John, T. J. and Jayabal, P. (1972). Oral polio vaccination of children in the tropics: I. The poor seroconversion rates and the absence of viral interference. *Am J Epidemiol.* 96, 263-269.

Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. P., Rochat, F. and Chassard, C. (2014). Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol.* 16, 2891-2904.

Kable, M. E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J., McLeod, J., Heidenreich, J. and Marco, M. L. (2016). The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio* 7, e00836-16.

Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D.N., Choi, Y. and Marrack, P. (1989). V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244, 811-813.

Karstrup, C. C., Pedersen, H. G., Jensen, T. K. and Agerholm, J. S. (2017). Bacterial invasion of the uterus and oviducts in bovine pyometra. *Theriogenology* 93, 93-98.

Kennedy, A.D., Wardenburg, J.B., Gardner, D.J., Long, D., Whitney, A.R., Braughton, K.R., Schneewind, O. and DeLeo, F.R. (2010). Targeting of alpha-hemolysin by active or passive immunization decreases severity of USA300 skin infection in a mouse model. *J Infect Dis.* 202, 1050-1058.

Kerro, O. D. and Nederbragt, H. (2002). Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. *Vet Q.* 24, 181-198.

Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C. and Ohman, D. E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylytic protease. *J Biol Chem.* 268, 7503-7508.

Kielian, T., Cheung, A. and Hickey, W. F. (2001). Diminished Virulence of an Alpha-Toxin Mutant of *Staphylococcus aureus* in Experimental Brain Abscesses. *Infect Immun* 69, 6902-6911.

Kim, Y. G. (2017). Microbiota influences vaccine and mucosal adjuvant efficacy. *Immune Netw.* 17, 20-24.

Kirk, J. H. and Bartlett, P. C. (1984). Nonclinical *Pseudomonas aeruginosa* mastitis in a dairy herd. *J Am Vet Med Assoc.* 184, 671-673.

Kuehn, J.S., Gorden, P.J., Munro, D., Rong, R., Dong, Q., Plummer, P.J., Wang, C. and Phillips, G.J. (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PloS One* 8, e61959.

Kumar, A. and Ting, Y. P. (2015). Presence of *Pseudomonas aeruginosa* influences biofilm formation and surface protein expression of *Staphylococcus aureus*. *Environ Microbiol.* 17, 4459-4468.

Laarman, A.J., Mijnheer, G., Mootz, J.M., Van Rooijen, W.J., Ruyken, M., Malone, C.L., Heezius, E.C., Ward, R., Milligan, G., Van Strijp, J.A. and De Haas, C.J. (2012). *Staphylococcus aureus* Staphopain A inhibits CXCR2-dependent neutrophil activation and chemotaxis. *EMBO J.* 31, 3607-3619.

Laarman, A. J., Ruyken, M., Malone, C. L., van Strijp, J. A., Horswill, A. R. and Rooijackers, S. H. (2011). *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J Immunol.* 1002948.

Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A. and Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *J Appl Environ Microbiol.* 70, 5644-5650.

Lammers, A., Nuijten, P. J. and Smith, H. E. (1999). The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. *FEMS Microbiol Lett.* 180, 103-109.

Landin, H., Mörk, M. J., Larsson, M. and Waller, K. P. (2015). Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 57, 81.

Larsen, H. D., Huda, A., Eriksen, N. H. and Jensen, N. E. (2000). Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet Microbiol.* 76, 153-162.

Lee, Y. (2005). Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. *FEMS Microbiol Lett.* 250, 157-162.

Lescourret, F., Coulon, J. B. and Faye, B. (1995). Predictive model of mastitis occurrence in the dairy cow. *J Dairy Sci.* 78, 2167-2177.

Li, J., Wang, W., Xu, S. X., Magarvey, N. A. and McCormick, J. K. (2011). *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 3360-3365.

Lima, S. F., Teixeira, A. G., Lima, F. S., Ganda, E. K., Higgins, C. H., Oikonomou, G. and Bicalho, R. C. (2017). The bovine colostrum microbiome and its association with clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 100, 3031-3042.

Lina, G., Boutite, F., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J. and Vandenesch, F. (2003). Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. *Appl Environ Microbiol.* 69, 18-23.

Li, Z., Wright, A. D. G., Yang, Y., Si, H. and Li, G. (2017). Unique bacteria community composition and co-occurrence in the milk of different ruminants. *Sci Rep.* 7, 40950.

Llewelyn, M. and Cohen, J. (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis.* 2, 156-162.

Lobo, S.A., Scott, A., Videira, M.A., Winpenny, D., Gardner, M., Palmer, M.J., Schroeder, S., Lawrence, A.D., Parkinson, T., Warren, M.J. and Saraiva, L.M. (2015). *Staphylococcus aureus* haem biosynthesis: characterisation of the enzymes involved in final steps of the pathway. *Mol Microbiol.* 97, 472-487.

Loeffler, D. A., Schat, K. A. and Norcross, N. L. (1986). Use of <sup>51</sup>Cr release to measure the cytotoxic effects of staphylococcal leukocidin and toxin neutralization on bovine leukocytes. *J Clin Microbiol.* 23, 416-420.

Lopez, C.C., Serio, A., Rossi, C., Mazzarrino, G., Marchetti, S., Castellani, F., Grotta, L., Fiorentino, F.P., Paparella, A. and Martino, G. (2016). Effect of diet supplementation with *Ascophyllum nodosum* on cow milk composition and microbiota. *J Dairy Sci.* 99, 6285-6297.

Madigan, Michael T., John M. Martinko, and Jack Parker. (1997) *Brock Biology of Microorganisms*. (New Jersey: Prentice Hall).

Mahmmod, Y. S., Klaas, I. C., Svennesen, L., Pedersen, K. and Ingmer, H. (2018). Communications of *Staphylococcus aureus* and non-aureus *Staphylococcus* species from bovine intramammary infections and teat apex colonization. *J Dairy Sci.*

Majerczyk, C. D., Sadykov, M. R., Luong, T. T., Lee, C., Somerville, G. A. and Sonenshein, A. L. (2008). *Staphylococcus aureus* CodY negatively regulates virulence gene expression. *J Bacteriol.* 190, 2257-2265.

Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A. and Desmasures, N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal* 27, 13-21.

Malone, C. L., Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2007). Biosynthesis of *Staphylococcus aureus* autoinducing peptides by using the synechocystis DnaB mini-intein. *Appl Environ Microbiol.* 73, 6036-6044.

Malouin, F. (2018) Novel control and treatment approaches for *Staphylococcus aureus* intramammary infections. *M2 Magazine* 21, 26-30.

Manninen, E., de Passillé, A. M., Rushen, J., Norring, M. and Saloniemi, H. (2002). Preferences of dairy cows kept in unheated buildings for different kind of cubicle flooring. *Appl Anim Behav Sci.* 75, 281-292.

Mao, S., Zhang, R., Wang, D. and Zhu, W. (2012). The diversity of the fecal bacterial community and its relationship with the concentration of volatile fatty acids in the feces during subacute rumen acidosis in dairy cows. *BMC Vet Res.* 8, 237.

Margolis, E., Yates, A. and Levin, B. R. (2010). The ecology of nasal colonization of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*: the role of competition and interactions with host's immune response. *BMC Microbiol.* 10, 59.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L. and Rodríguez, J.M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 143, 754-758.

Mashburn, L. M., Jett, A. M., Akins, D. R. and Whiteley, M. (2005). *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during *in vivo* coculture. J Bacteriol. 187, 554-566.

McCaig, L. F., McDonald, L. C., Mandal, S. and Jernigan, D. B. (2006). *Staphylococcus aureus*–associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. Emerg Infect Dis. 12(11), 1715.

McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R. and Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. ISME J. 6, 610.

Medrano-Galarza, C., Gibbons, J., Wagner, S., De Passillé, A. M. and Rushen, J. (2012). Behavioral changes in dairy cows with mastitis. J Dairy Sci. 95, 6994-7002.

Melchior, M. B., Fink-Gremmels, J. and Gaastra, W. (2007). Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. Vet Microbiol. 125, 141-149.

Melchior, M. B., Vaarkamp, H. and Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? Vet J. 171, 398-407.



Melter, O. and Radojevič, B. (2010). Small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Folia microbiologica* 55, 548-558.

Michelsen, C. F., Christensen, A. M. J., Bojer, M. S., Høiby, N., Ingmer, H. and Jelsbak, L. (2014). *Staphylococcus aureus* alters growth activity, autolysis and antibiotic tolerance in a human host adapted *Pseudomonas aeruginosa* lineage. *J Bacteriol.* JB-02006

Michel, V., Hauwuy, A. and Chamba, J. F. (2006). Gestion de la flore microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs. *Renc. Rech. Rum* 13, 309-312.

Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B. and Montel, M. C. (2012). Variability of microbial teat skin flora in relation to farming practices and individual dairy cow characteristics. *Dairy Sci Technol.* 92, 265-278.

Moraveji, Z., Tabatabaei, M., Aski, H. S. and Khoshbakht, R. (2014). Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine, southern Iran. *Iran J Vet Res* 15, 326.

More, S. J. (2009). Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry. *Ir Vet J.* 62, S5.

Moussavi, A. H., Mesgaran, M. D. and Gilbert, R. O. (2012). Effect of mastitis during the first lactation on production and reproduction performance of Holstein cows. *Trop Anim Health Prod.* 44, 1567-1573.

Mpatswenumugabo, J. P., Bebora, L. C., Gitao, G. C., Mobegi, V. A., Iraguha, B., Kamana, O. and Shumbusho, B. (2017). Prevalence of subclinical mastitis and distribution of pathogens in dairy farms of Rubavu and Nyabihu districts, Rwanda. *J Vet Med.* 2017.

Munsch-Alatossava, P. and Alatossava, T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol Res.* 161, 334-346.

Muscholl-Silberhorn, A., Samberger, E. and Wirth, R. (1997). Why does *Staphylococcus aureus* secrete an *Enterococcus faecalis*-specific pheromone?. *FEMS Microbiol Lett.* 157, 261-266.

Nair, N., Biswas, R., Götz, F. and Biswas, L. (2014). Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infect Immun.* 82, 2162-2169.

Nam, H.M., Lim, S.K., Kang, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Jang, K.C., Joo, Y.S. and Jung, S.C. (2009). Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J Dairy Sci.* 92, 2020-2026.

Neave, F. K., Dodd, F. H., Kingwill, R. G. and Westgarth, D. R. (1969). Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. *J Dairy Sci.* 52, 696-707.

Netz, D. J. A., Pohl, R., Beck-Sickinger, A. G., Selmer, T., Pierik, A. J., de Freire Bastos, M. D. C. and Sahl, H. G. (2002). Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol.* 319, 745-756.

Ngba Essebe, C., Visvikis, O., Fines-Guyon, M., Vergne, A., Cattoir, V., Lecoustumier, A. and Dunyach-Remy, C. (2017). Decrease of *Staphylococcus aureus* Virulence by *Helcococcus kunzii* in a *Caenorhabditis elegans* Model. *Front Cell Infect Microbiol.* 7, 77.

Nouaille, S., Rault, L., Jeanson, S., Loubière, P., Le Loir, Y. and Even, S. (2014). Contribution of *Lactococcus lactis* reducing properties to the downregulation of a major virulence regulator in *Staphylococcus aureus*, the agr system. *Appl Environ Microbiol.* AEM-02287.

Nourbakhsh, F. and Namvar, A. E. (2016). Detection of genes involved in biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hyg Infect Control* 11.

O'Callaghan, R.J., Callegan, M.C., Moreau, J.M., Green, L.C., Foster, T.J., Hartford, O.M., Engel, L.S. and Hill, J.M. (1997). Specific roles of alpha-toxin and beta-toxin during *Staphylococcus aureus* corneal infection. *Infect Immun.* 65, 1571-1578.

Ocaña, V. S., Pesce de Ruiz Holgado, A. A. and Nader-Macías, M. E. (1999). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 23, 87-92.

Ofek, I., Hasty, D. L. and Doyle, R. J. (2003). Bacterial adhesion to animal cells and tissues. ASM press.

Ohnishi, M., Sawada, T., Marumo, K., Harada, K., Hirose, K., Shimizu, A., Hayashimoto, M., Sato, R., Uchida, N. and Kato, H. (2012). Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of bovine *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from a mastitis outbreak. *Lett Appl Microbiol.* 54, 572-576.

Oikonomou, G., Bicalho, M.L., Meira, E., Rossi, R.E., Foditsch, C., Machado, V.S., Teixeira, A.G.V., Santisteban, C., Schukken, Y.H. and Bicalho, R.C. (2014). Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. PloS One 9, e85904.

Oikonomou, G., Machado, V. S., Santisteban, C., Schukken, Y. H. and Bicalho, R. C. (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. PLoS One 7, e47671.

Oliver, S.P., Gillespie, B.E., Headrick, S.J., Moorehead, H., Lunn, P., Dowlen, H.H., Johnson, D.L., Lamar, K.C., Chester, S.T. and Moseley, W.M. (2004). Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 87, 2393-2400.

O'Riordan, K. and Lee, J. C. (2004). *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rev. 17, 218-234.

Oscarsson, J., Tegmark-Wisell, K. and Arvidson, S. (2006). Coordinated and differential control of aureolysin (aur) and serine protease (sspA) transcription in *Staphylococcus aureus* by sarA, rot and agr (RNAIII). Int J Med Microbiol. 296, 365-380.

Otto, M., Echner, H., Voelter, W. and Götz, F. (2001). Pheromone Cross-Inhibition between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun. 69, 1957-1960.

Ozeri, V., Rosenshine, I., Mosher, D. F., Fässler, R., and Hanski, E. (1998). Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol.* 30, 625-637.

Painter, K. L., Krishna, A., Wigneshweraraj, S. and Edwards, A. M. (2014). What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during *Staphylococcus aureus* bacteremia?. *Trends Microbiol.* 22, 676-685.

Pal, A. and Ramana, K. V. (2010). Purification and characterization of bacteriocin from *Weissella paramesenteroides* DFR-8, an isolate from cucumber (*Cucumis sativus*). *J Food Biochem.* 34, 932-948.

Pantoja, J. C. F., Hulland, C. and Ruegg, P. L. (2009). Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *J Dairy Sci.* 92, 139-148.

Papageorgiou, A. C. and Acharya, K. R. (2000). Microbial superantigens: from structure to function. *Trends Microbiol.* 8, 369-375.

Patel, A. H., Nowlan, P., Weavers, E. D. and Foster, T. (1987). Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement. *Infect Immun.* 55, 3103-3110.

Patriarca, P. A., Wright, P. F. and John, T. J. (1991). Factors affecting the immunogenicity of oral poliovirus vaccine in developing countries. *Rev Infect Dis.* 13, 926-939.

Persson, Y., Nyman, A. K. J., & Grönlund-Andersson, U. (2011). Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* 53, 36.

Peterson, C. T., Sharma, V., Elmén, L., & Peterson, S. N. (2015). Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *J Clin Exp Immunol.* , 179, 363-377.

Petersson-Wolfe, C. S., Mullarky, I. K. and Jones, G. M. (2010). *Staphylococcus aureus* mastitis: cause, detection, and control.

Peton, V., Bouchard, D. S., Almeida, S., Rault, L., Falentin, H., Jardin, J., & Azevedo, V. (2014). Fine-tuned characterization of *Staphylococcus aureus* Newbould 305, a strain associated with mild and chronic mastitis in bovines. *Vet Res*, 45, 106.

Phaneuf, D., Côté, I., Dumas, P., Ferron, L. A. and LeBlanc, A. (1999). Evaluation of the contamination of marine algae (seaweed) from the St. Lawrence River and likely to be consumed by humans. *Environ Res.* 80, S175-S182.

Piccart, K., Piepers, S., Verbeke, J., de Sousa, N. M., Beckers, J. F. and De Vliegher, S. (2015). Milk prolactin response and quarter milk yield after experimental infection with coagulase-negative staphylococci in dairy heifers. *J Dairy Sci.* 98, 4593-4600.

Piepers, S., Prenafeta, A., Verbeke, J., De Visscher, A., March, R. and De Vliegher, S. (2017). Immune response after an experimental intramammary challenge with killed *Staphylococcus aureus* in cows and heifers vaccinated and not vaccinated with Startvac, a polyvalent mastitis vaccine. J Dairy Sci. 100, 769-782.

Piessens, V., Van Coillie, E., Verbist, B., Supré, K., Braem, G., Van Nuffel, A., De Vuyst, L., Heyndrickx, M. and De Vliegher, S. (2011). Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. J Dairy Sci. 94, 2933-2944.

Pichette-Jollette, S., Millette, G., Demontier, E., Bran-Barrera, D., Cyrenne, M., Ster, C., & Roy, J. P. (2019). Partial prediction of the duration and the clinical status of *Staphylococcus aureus* bovine intramammary infections based on the phenotypic and genotypic analysis of isolates. Vet Microbiol, 228, 188-195.

Pinedo, P. J., Fleming, C. and Risco, C. A. (2012). Events occurring during the previous lactation, the dry period, and peripartum as risk factors for early lactation mastitis in cows receiving 2 different intramammary dry cow therapies. J Dairy Sci. 95, 7015-7026.

Podder, M. P., Rogers, L., Daley, P. K., Keefe, G. P., Whitney, H. G. and Tahlan, K. (2014). *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. PloS One 9, e106518.

Powers, M. E., Kim, H. K., Wang, Y. and Bubeck Wardenburg, J. (2012). ADAM10 mediates vascular injury induced by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin. J Infect Dis. 206, 352-356.

Proctor, R. A., Von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M. and Peters, G. (2006). Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* 4, 295.

Projan, S. J. (1997). The molecular basis of pathogenicity. *The Staphylococci in human disease*, 55-81.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J. and Glöckner, F. O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188-7196.

Pyörälä, S. and Pyörälä, E. (1997). Accuracy of methods using somatic cell count and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity in milk to assess the bacteriological cure of bovine clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 80, 2820-2825.

Qazi, S.N., Counil, E., Morrissey, J., Rees, C.E., Cockayne, A., Winzer, K., Chan, W.C., Williams, P. and Hill, P.J. (2001). *agr* Expression Precedes Escape of Internalized *Staphylococcus aureus* from the Host Endosome. *Infect Immun.* 69, 7074-7082.

Raats, D., Offek, M., Minz, D. and Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiol.* 28, 465-471.

Ralph, A., McBride, J. and Currie, B. J. (2004). Transmission of *Burkholderia pseudomallei* via breast milk in northern Australia. *Pediatr Infect Dis J.* 23, 1169-1171.



Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. and Tobes, R. (2005). The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69, 326-356.

Ramsey, M. M., Freire, M. O., Gabrilksa, R. A., Rumbaugh, K. P. and Lemon, K. P. (2016). *Staphylococcus aureus* shifts toward commensalism in response to *Corynebacterium* species. *Front Microbiol.* 7, 1230.

Rasmussen, M. D., Frimer, E. S., Galton, D. M. and Petersson, L. G. (1992). The influence of premilking teat preparation and attachment delay on milk yield and milking performance. *J Dairy Sci.* 75, 2131-2141.

Rasolofo, E. A., St-Gelais, D., LaPointe, G. and Roy, D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol.* 138, 108-118.

Ray, A. J., Pultz, N. J., Bhalla, A., Aron, D. C. and Donskey, C. J. (2003). Coexistence of vancomycin-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* in the intestinal tracts of hospitalized patients. *Clin Infect Dis.* 37, 875-881.

Regev-Yochay, G., Trzciński, K., Thompson, C. M., Malley, R. and Lipsitch, M. (2006). Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: *in vitro* hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 188, 4996-5001.

Reyes-Robles, T. and Torres, V. J. (2016). *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins.

Reyher, K. K. and Dohoo, I. R. (2011). Diagnosing intramammary infections: evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. *J Dairy Sci.* 94, 3387-3396.

Reynolds, K. A., Mena, K. D. and Gerba, C. P. (2008). Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev Environ Contam Toxicol.* 117-158

Richardson, L.L., Goldberg, W.M., Kuta, K.G., Aronson, R.B., Smith, G.W., Ritchie, K.B., Halas, J.C., Feingold, J.S. and Miller, S.L. (1998). Florida's mystery coral-killer identified. *Nature*, 392, 557.

Roy, J. P., Du Tremblay, D., DesCôteaux, L., Messier, S., Scholl, D. and Bouchard, É. (2007). Effect of precalving intramammary treatment with pirlimycin in nulliparous Holstein heifers. *Can J Vet Res.* 71, 283.

Ryan, M. P. and Adley, C. C. (2014). *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33, 291-304.

Ryan, M. P., Pembroke, J. T. and Adley, C. C. (2011). Genotypic and phenotypic diversity of *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa* isolates from clinical and environmental sources including High-purity Water. Diversity in *Ralstonia pickettii*. *BMC Microbiol.* 11, 194.

Saeed, S., Ahmad, S., and Rasool, S. A. (2004). Antimicrobial spectrum, production and mode of action of staphylococcin 188 produced by *Staphylococcus aureus* 188. *Pa J Pharm Sci.* 17, 1-8.

Sağlam, A. G., Şahin, M., Çelik, E., Çelebi, Ö., Akça, D. and Otlı, S. (2017). The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against to *Staphylococcus aureus*. Vet World 10, 1481.

Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Calus, S.T., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N.J. and Walker, A.W. (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. BMC Biol. 12, 87.

Sargeant, J. M., Scott, H. M., Leslie, K. E., Ireland, M. J. and Bashiri, A. (1998). Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. Can Vet J. 39, 33.

Schepers, A. J., Lam, T. J. G. M., Schukken, Y. H., Wilmink, J. B. M. and Hanekamp, W. J. A. (1997). Estimation of variance components for somatic cell counts to determine thresholds for uninfected quarters. J Dairy Sci. 80, 1833-1840.

Schukken, Y.H., Bronzo, V., Locatelli, C., Pollera, C., Rota, N., Casula, A., Testa, F., Scaccabarozzi, L., March, R., Zalduendo, D. and Guix, R. (2014). Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. J Dairy Sci. 97, 5250-5264.

Schukken, Y.H., González, R.N., Tikofsky, L.L., Schulte, H.F., Santisteban, C.G., Welcome, F.L., Bennett, G.J., Zurakowski, M.J. and Zadoks, R.N. (2009). CNS mastitis: Nothing to worry about?. Vet Microbiol. 134, 9-14.

Schukken, Y.H., Hertl, J., Bar, D., Bennett, G.J., González, R.N., Rauch, B.J., Santisteban, C., Schulte, H.F., Tauer, L., Welcome, F.L. and Gröhn, Y.T. (2009). Effects of repeated gram-positive and gram-negative clinical mastitis episodes on milk yield loss in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci.* 92, 3091-3105.

Schukken, Y. H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L. and Gonzalez, R. N. (2003). Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet Res.* 34, 579-596.

Shang, F., Xue, T., Sun, H., Xing, L., Zhang, S., Yang, Z., & Sun, B. (2009). The *Staphylococcus aureus* GGDEF domain-containing protein, GdpS, influences protein A gene expression in a cyclic diguanylic acid-independent manner. *Infect Immun*, 77, 2849-2856.

Sharma-Kuinkel, B. K., Mann, E. E., Ahn, J. S., Kuechenmeister, L. J., Dunman, P. M. and Bayles, K. W. (2009). The *Staphylococcus aureus* LytSR two-component regulatory system affects biofilm formation. *J Bacteriol.* 191, 4767-4775.

Sompolinsky, D., Cohen, M. and Ziv, G. (1974). Epidemiological and biochemical studies on thiamine-less dwarf-colony variants of *Staphylococcus aureus* as etiological agents of bovine mastitis. *Infect Immun.* 9, 217-228.

Sordillo, L. M. and Streicher, K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7, 135-146.

Spika, J. S., Verbrugh, H. A. and Verhoef, J. (1981). Protein A effect on alternative pathway complement activation and opsonization of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 34, 455-460.

Stephan, R., Annemüller, C., Hassan, A. A. and Lämmli, C. (2001). Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet Microbiol.* 78, 373-382.

Strandberg, Y., Gray, C., Vuocolo, T., Donaldson, L., Broadway, M. and Tellam, R. (2005). Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different innate immune responses in bovine mammary epithelial cells. *Cytokine* 31, 72-86.

Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K. I., Tajima, A., Iwase, T. and Mizunoe, Y. (2013). *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction. *J Bacteriol.* JB-01672.

Sullivan, Å., Edlund, C. and Nord, C. E. (2001). Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis.* 1, 101-114.

Supersac, G., Piemont, Y., Kubina, M., Prevost, G. and Foster, T. J. (1998). Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using *ahlg*-deficient mutant of *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog.* 24, 241-251.

Sutherland, A. D., and Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *Int J Food Microbiol.* 21, 279-292.

Sutra, L. and Poutrel, B. (1994). Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol. 40, 79-89.

Sutton, J. D. (1989). Altering milk composition by feeding. J Dairy Sci. 72, 2801-2814.

Sztachañska, M., Barański, W., Janowski, T., Pogorzelska, J. and Zduńczyk, S. (2016). Prevalence and etiological agents of subclinical mastitis at the end of lactation in nine dairy herds in North-East Poland. Pol J Vet Sci. 19, 119-124.

Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H. D. and Pyörälä, S. (2006). Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. Vet Microbiol. 115, 199-207.

Te Giffel, M. C. and Beumer, R. R. (1998). Isolation, identification and characterization of *Bacillus cereus* in the dairy industry. Tijdschrift voor diergeneeskunde 123, 628.

Te Giffel, M. T., Wagendorp, A., Herrewegh, A. and Driehuis, F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. Antonie van Leeuwenhoek 81, 625-630.

Tenhagen, B. A., Köster, G., Wallmann, J. and Heuwieser, W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. J Dairy Sci. 89, 2542-2551.

Throup, J. P., Zappacosta, F., Lunsford, R. D., Annan, R. S., Carr, S. A., Lonsdale, J. T., and Burnham, M. K. (2001). The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function. *Biochemistry* 40, 10392-10401.

Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. In factors influencing the bacteriological quality of raw milk. *Int Dairy Federation Bulletin* 120.

Truchetti, G., Bouchard, É., DesCôteaux, L., Scholl, D. and Roy, J. P. (2014). Efficacy of extended intramammary ceftiofur therapy against mild to moderate clinical mastitis in Holstein dairy cows: a randomized clinical trial. *Can J Vet Res.* 78, 31-37.

Tucker, C. B., Weary, D. M. and Fraser, D. (2003). Effects of three types of free-stall surfaces on preferences and stall usage by dairy cows. *J Dairy Sci.* 86, 521-529.

US Food and Drug Administration. (2009). Grade “A” pasteurized milk ordinance. US Food and Drug Administration, 52.

Vacheyrou, M., Normand, A. C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R. and Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int J Food Microbiol.* 146, 253-262.

Vaerewijck, M. J. M., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hoste, B. and Heyndrickx, M. (2001). Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. J Appl Microbiol. 91, 1074-1084.

Vanderhaeghen, W., Piepers, S., Leroy, F., Van Coillie, E., Haesebrouck, F. and De Vliegher, S. (2014). Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. J Dairy Sci. 97, 5275-5293.

Varma, P., Dinesh, K. R., Menon, K. K. and Biswas, R. (2010). *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. J Food Sci. 75, M546-M551.

Vaudaux, P., Kelley, W. L. and Lew, D. P. (2006). *Staphylococcus aureus* small colony variants: difficult to diagnose and difficult to treat.

Veh, K. A., Klein, R. C., Ster, C., Keefe, G., Lacasse, P., Scholl, D. and Ribon, A. O. B. (2015). Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period. J Dairy Sci. 98, 155-168.

Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C. and Montel, M. C. (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk?. Food Microbiol. 26, 305-310.

Vesikari, T., Isolauri, E., D'Hondt, E., Delem, A., André, F. and Zissis, G. (1984). Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. Lancet 323, 977-981.



Viçosa, G. N., Botta, C., Ferrocino, I., Bertolino, M., Ventura, M., Nero, L. A. and Cocolin, L. (2018). *Staphylococcus aureus* undergoes major transcriptional reorganization during growth with *Enterococcus faecalis* in milk. Food Microbiol. 73, 17-28.

Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D. and Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. J Dairy Sci. 83, 1905-1911.

Vlkova, H., Babak, V., Vrtkova, I., Cervinkova, D., Marosevic, D., Moravkova, M. and Jaglic, Z. (2017). Epidemiology of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* and mastitis streptococci in a dairy cattle herd with a history of recurrent clinical mastitis. Pol J Vet Sci. 20, 133-139.

Vreman, K., Spoelstra, S. F. and Oude Elferink, S. J. W. H. (2001). Aerobic spores occur in vast quantities in silages from laboratory and farm silos. Das Wirtschaftseigene Futter 44, 1-8.

Walker, A. (2010). Breast milk as the gold standard for protective nutrients. J Pediatr. 156, S3-S7.

Wang, C.Y., Wu, H.D., Lee, L.N., Chang, H.T., Hsu, Y.L., Yu, C.J., Yang, P.C. and Hsueh, P.R. (2006). Pasteurization is effective against multidrug-resistant bacteria. Am J Infect Control 34, 320-322.

Wang, L., Si, W., Xue, H. and Zhao, X. (2017). A fibronectin-binding protein (FbpA) of *Weissella cibaria* inhibits colonization and infection of *Staphylococcus aureus* in mammary glands. *Cell Microbiol.* 19, e12731.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 73, 5261-5267.

Wardenburg, J. B., Patel, R. J. and Schneewind, O. (2007). Surface proteins and exotoxins are required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect Immun.* 75, 1040-1044.

Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., and Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 5, 751-762.

White, J., Herman, A., Pullen, A. M., Kubo, R., Kappler, J. W. and Marrack, P. (1989). The V $\beta$ -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56, 27-35.

Wilcox, M. H. (2003). *Clostridium difficile* infection and pseudomembranous colitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 17, 475-493.

Williams, R. E. O. (1963). Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.* 27, 56.

Wilson, G. J., Tuffs, S. W., Wee, B. A., Seo, K. S., Park, N., Connelley, T., & Fitzgerald, J. R. (2018). Bovine *Staphylococcus aureus* superantigens stimulate the entire T cell repertoire of cattle. *Infect Immun*, 86(11), e00505-18.

Wolf, J., Wolfová, M. and Štípková, M. (2010). A model for the genetic evaluation of number of clinical mastitis cases per lactation in Czech Holstein cows. *J Dairy Sci*. 93, 1193-1204.

Woo, P. C., Tsoi, H. W., Wong, L. P., Leung, H. C. and Yuen, K. Y. (1999). Antibiotics modulate vaccine-induced humoral immune response. *Clin Diagn Lab Immunol*. 6, 832-837.

Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokoyama, K. and Tamiya, E. (2002). Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochem Biophys Res Commun*. 294, 1138-1143.

Yarwood, J. M., McCormick, J. K. and Schlievert, P. M. (2001). Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 183, 1113-1123.

Young, W., Hine, B. C., Wallace, O. A., Callaghan, M. and Bibiloni, R. (2015). Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ* 3, e888.

Zadoks, R. N., Middleton, J. R., McDougall, S., Katholm, J. and Schukken, Y. H. (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16, 357-372.

Zand, Siavosh M. (1976). Indexes associated with information theory in water quality. Journal (Water Pollution Control Federation), 2026-2031.

Zárate, G. and Nader-Macias, M. E. (2006). Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. Lett Appl Microbiol. 43, 174-180.

Zdanowicz, M., Shelford, J. A., Tucker, C. B., Weary, D. M. and Von Keyserlingk, M. A. G. (2004). Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. J Dairy Sci. 87, 1694-1701.

Zebeli, Q. and Metzler-Zebeli, B. U. (2012). Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. Res Vet Sci. 93, 1099-1108.

Zhang, L., Boeren, S., Van Hooijdonk, A. C. M., Vervoort, J. M. and Hettinga, K. A. (2015). A proteomic perspective on the changes in milk proteins due to high somatic cell count. J Dairy Sci. 98, 5339-5351.

Zhang, R., Huo, W., Zhu, W. and Mao, S. (2015). Characterization of bacterial community of raw milk from dairy cows during subacute ruminal acidosis challenge by high-throughput sequencing. J Sci Food Agric. 95, 1072-1079.

Zhu, W., Murray, P. R., Huskins, W. C., Jernigan, J. A., McDonald, L. C., Clark, N. C. and Frace, M. (2010). Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like vanA plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemoter. 54, 4314-4320.

